

**Titre:** Histologie massive basée sur la microscopie à tomographie par  
Title: cohérence optique

**Auteur:** Alexandre Castonguay  
Author:

**Date:** 2017

**Type:** Mémoire ou thèse / Dissertation or Thesis

**Référence:** Castonguay, A. (2017). Histologie massive basée sur la microscopie à  
Citation: tomographie par cohérence optique [Ph.D. thesis, École Polytechnique de  
Montréal]. PolyPublie. <https://publications.polymtl.ca/2819/>

 **Document en libre accès dans PolyPublie**  
Open Access document in PolyPublie

**URL de PolyPublie:** <https://publications.polymtl.ca/2819/>  
PolyPublie URL:

**Directeurs de  
recherche:** Frédéric Lesage  
Advisors:

**Programme:** Génie biomédical  
Program:

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

HISTOLOGIE MASSIVE BASÉE SUR LA MICROSCOPIE À TOMOGRAPHIE PAR  
COHÉRENCE OPTIQUE

ALEXANDRE CASTONGUAY

INSTITUT DE GÉNIE BIOMÉDICAL  
ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

THÈSE PRÉSENTÉE EN VUE DE L'OBTENTION  
DU DIPLÔME DE PHILOSOPHIAE DOCTOR  
(GÉNIE BIOMÉDICAL)

OCTOBRE 2017



UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

ÉCOLE POLYTECHNIQUE DE MONTRÉAL

Cette thèse intitulée :

HISTOLOGIE MASSIVE BASÉE SUR LA MICROSCOPIE À TOMOGRAPHIE PAR  
COHÉRENCE OPTIQUE

présentée par : CASTONGUAY Alexandre

en vue de l'obtention du diplôme de : Philosophiae Doctor

a été dûment acceptée par le jury d'examen constitué de :

Mme PÉRIÉ-CURNIER Delphine, Doctorat, présidente

M. LESAGE Frédéric, Ph. D., membre et directeur de recherche

M. COMTOIS Philippe, Ph. D., membre

M. CÔTÉ Daniel, Ph. D., membre externe

## DÉDICACE

*À mon fils à naître,  
ton existence a déjà apporté beaucoup de bonheur dans notre famille.  
Nous avons tous hâte de te rencontrer.*

## REMERCIEMENTS

En premier lieu, je dois remercier le Fonds de Recherche du Québec – Nature et Technologies pour le soutien financier et une certaine confiance en soi qui m’a été donnée à travers l’octroi d’une bourse doctorale. D’autre part, plusieurs personnes de mon entourage ont contribué à la réalisation de ma thèse et à mon bien-être durant de ce long parcours.

Tout d’abord, je tiens à remercier mon directeur Frédéric Lesage de m’avoir donné l’opportunité de faire mon doctorat dans son laboratoire. Sa grande disponibilité, nos discussions franches et allant droit au but, ainsi que son savoir m’ont permis d’avancer dans un environnement dynamique et m’ont données une solide formation pour le marché du travail.

Je voudrais aussi faire une mention spéciale à mes collègues étudiants. Particulièrement, je veux remercier Samuel Bélanger qui, à mon arrivé au labo en t’en qu’associé de recherche, m’était d’une aide précieuse pour la conception de montages optique et m’a aussi convaincu du bien-fondé d’entreprendre le doctorat. Au fil des années et de longues discussions, tant au labo qu’au McCarold, nous sommes devenus plus que des collègues, mais de bons amis. Je veux aussi remercier Joël Lefebvre avec qui j’ai collaboré de près puisque nos projets se chevauchaient. J’ai trouvé en Joël quelqu’un avec qui il était facile de travailler et qui m’a aidé beaucoup grâce à ses connaissances informatiques hors pairs. Je veux aussi remercier tous les autres membres du LIOM, avec qui j’ai partagé des discussions fort intéressantes et qui ont su, parfois malgré eux, me faire rire.

Je veux aussi remercier toute ma famille qui m’a toujours supporté au cours de ces dernières années et m’a encouragé à aller au bout de moi-même. Je tiens à remercier aussi mes amis à l’extérieur du labo. Le temps passé avec vous m’a permis de décrocher de temps en temps du travail et de me changer les idées.

Enfin, je veux remercier la personne avec qui j’ai partagé ma vie au cours des dernières années et qui m’a été d’un soutien énorme. Charlotte, tu as été mon rayon de soleil à la fin de toutes ces journées difficiles. Je t’aime.

## RÉSUMÉ

L'histologie consiste en l'étude des tissus vivants à l'échelle microscopique. Cette discipline a permis de grandes avancées, tant en biologie qu'en médecine, allant de la découverte de la cellule, jusqu'à devenir l'outil de prédilection pour le diagnostic de nombreuses maladies. L'avènement de l'histologie s'est fait en parallèle avec le développement du microscope, nécessaire pour visualiser les tissus sous grossissement. La microscopie est par nature limitée à imager une très petite région d'intérêt et ne donne donc qu'un petit aperçu de l'échantillon en entier. Récemment, des microscopes tomographiques sériels combinant la microscopie au sectionnement du tissu ont permis d'imager automatiquement de larges échantillons de tissu à l'échelle du micron. Des algorithmes spécifiquement développés pour ces appareils permettent de reconstruire dans une grande matrice tridimensionnelle l'échantillon imagé.

Dans le cadre de cette thèse, un tel système a été construit avec la tomographie par cohérence optique comme modalité d'imagerie. Cette technique d'imagerie, qui est basée sur la réflectance intrinsèque des tissus, permet une acquisition de données volumétriques à haut débit en plus d'offrir une haute résolution spatiale et une bonne pénétration dans les tissus. Le système développé a permis d'imager de façon fiable et répétable un organe de souris en l'espace de quelques heures avec un voxel d'une taille de  $(4,88 \times 4,88 \times 6,5) \mu\text{m}$ . L'objectif général de ce projet était d'utiliser le système développé pour faire des études de groupe sur la souris, pour répondre à des questions spécifiques.

D'abord, une validation du système d'imagerie était de mise pour vérifier que la plateforme d'imagerie donne une représentation fidèle du tissu *in vivo*. En imageant une population de cerveaux de souris *in vivo* en imagerie par résonance magnétique, puis avec la plateforme d'imagerie, les déformations entre les modalités d'imageries furent quantifiées. L'utilisation d'outils d'analyses morphométriques développés pour l'imagerie par résonance magnétique a démontré que le sectionnement et la fixation ne déforment pas de façon significative le tissu et que les algorithmes permettant la reconstruction en un volume tridimensionnel donnent une représentation fidèle du cerveau *in vivo*. Cette démonstration ouvre la voie à des études de groupes s'intéressant à des altérations microscopiques dans un organe entier.

Considérant la répétabilité et la fiabilité prouvée de la plateforme d'imagerie, l'effet du vieillissement normal sur le cœur de la souris a été examiné. En comparant les cœurs de souris jeunes à ceux de souris âgées, il a été mis en évidence que des changements dans l'architecture du myocarde s'opèrent en vieillissant. Chez les souris âgées la paroi du ventricule gauche s'épaissit résultant en une diminution du taux de changement d'orientation des fibres musculaires dans cette même paroi. En imageant préalablement la fonction cardiaque de ces mêmes cœurs *in vivo*, il fut démontré que ces changements microscopiques s'accompagnent de changements fonctionnels.

## ABSTRACT

Histology consists in the study of biological tissue at the microscopic scale. This discipline has led to great advances in biology, such as permitting the discovery of the cell and in medicine, where it is to this day the gold standard to detect many diseases. The advent of histology has been brought to in parallel with the development of microscopy, necessary to visualize tissues under magnification. Microscopy is limited to imaging small field of views, thus giving only a small representation of the entire sample. Recently, serial scanning microscopes, combining light microscopy and tissue sectioning have allowed to automatically image large tissue samples, expanding the imaged region to the order of the centimeter while keeping micrometer scale resolution. Post processing algorithms, specifically developed for serial scanning microscopes, are used to reconstruct in large 3D datasets the imaged sample.

In this thesis, a serial scanning optical coherence tomography microscope was developed. This imaging modality, based on the intrinsic reflectance of tissue, allows high-speed acquisition of volumetric datasets at micrometer scale spatial resolution and penetrates deep in biological tissue. The developed platform allowed reliable and repeatable imaging of whole mouse organs within a time lapse of a few hours with a voxel size of (4,88 x 4,88 x 6,5)  $\mu\text{m}$ . The general objective of this project was to use this developed imaging platform to perform group studies on mice, to answer specific questions on tissue morphology.

First, a system validation was required to verify that the imaging platform gives reliable representation of *in vivo* tissue. By imaging a group of *in vivo* mice brains with magnetic resonance imaging before serial sectioning, inter-modality deformations were quantified. The use of morphometric analysis tools developed for magnetic resonance imaging demonstrated that tissue sectioning and fixation does not significantly deform tissue and that reconstruction algorithms to obtain a large 3D dataset give a reliable representation of the *in vivo* brain. This proof of concept investigation opens the way to further group studies looking at microscopic alterations in an entire small animal organ.

Considering the previously demonstrated repeatability and reliability of the imaging platform, the effect of normal aging on the mouse heart was examined. By comparing hearts of young and old

mice, it was shown that architectural changes in the myocardium occur with aging. In old mice, there was a thickening of the left ventricle wall, which showed a decrease of muscle fiber orientation change. Prior imaging of the cardiac function *in vivo* revealed that these microscopic changes in morphology were accompanied by changes in the heart function.

## TABLE DES MATIÈRES

|   |      |
|---|------|
| DÉDICACE .....  | III  |
| REMERCIEMENTS.....  | IV   |
| RÉSUMÉ .....  | V    |
| ABSTRACT.....   | VII  |
| TABLE DES MATIÈRES .....                                  | IX   |
| LISTE DES TABLEAUX.....                                   | XII  |
| LISTE DES FIGURES .....                                   | XIII |
| LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS .....                    | XV   |
| CHAPITRE 1 INTRODUCTION .....                             | 1    |
| 1.1 CONTEXTE ET PROBLÉMATIQUE .....                       | 1    |
| 1.1.1 Histologie conventionnelle .....                    | 1    |
| 1.1.2 Histologie sérielle .....                           | 2    |
| 1.2 OBJECTIFS .....                                       | 6    |
| CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE.....                      | 10   |
| 2.1 MICROSCOPIE TOMOGRAPHIQUE SÉRIELLE .....              | 10   |
| 2.2 MICROSCOPIE À TOMOGRAPHIE PAR COHÉRENCE OPTIQUE ..... | 13   |
| 2.2.1 Théorie .....                                       | 13   |
| 2.2.2 Origine du signal dans les tissus biologiques.....  | 24   |
| CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE.....                              | 29   |
| 3.1 MICROSCOPE À TOMOGRAPHIE PAR COHÉRENCE OPTIQUE .....  | 29   |
| 3.1.1 Bras échantillon.....                               | 31   |
| 3.1.2 Bras de référence.....                              | 33   |
| 3.1.3 Acquisition des volumes OCT .....                   | 33   |
| 3.1.4 Caractérisation de l'OCT .....                      | 39   |
| 3.2 VIBRATOME .....                                       | 42   |
| 3.2.1 Design mécanique .....                              | 42   |
| 3.2.2 Préparation des tissus biologiques .....            | 44   |



|   |  |    |
|---|--|----|
| 3.3   | PLATEFORME D'HISTOLOGIE MASSIVE COMBINANT OCT ET VIBRATOME ..... | 46 |
| 3.3.1   | Préparation de l'acquisition .....                               | 46 |
| 3.3.2   | Procédure d'acquisition.....                                     | 48 |
| 3.4   | RECONSTRUCTION DES VOLUMES EN 3D.....                            | 49 |
| CHAPITRE 4 ARTICLE 1 : COMPARING 3D SERIAL OPTICAL COHERENCE        |  |    |
| TOMOGRAPHY HISTOLOGY TO MRI IMAGING IN THE ENTIRE MOUSE BRAIN ..... |  | 52 |
| 4.1   | INTRODUCTION .....   | 53 |
| 4.2   | MATERIALS AND METHODS .....                                      | 55 |
| 4.2.1   | In vivo measurements .....                                       | 55 |
| 4.2.2   | Ex vivo measurements .....                                       | 56 |
| 4.2.3   | Serial OCT measurements .....                                    | 56 |
| 4.2.4   | Data processing .....  | 58 |
| 4.3   | RESULTS .....  | 62 |
| 4.4   | DISCUSSION .....   | 69 |
| 4.5   | CONCLUSION .....   | 72 |
| 4.6   | REFERENCES .....   | 73 |
| 4.7   | SUPPLEMENTARY FIGURE .....                                       | 80 |
| CHAPITRE 5 ARTICLE 2 : SERIAL OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY REVEALS  |  |    |
| AN ASSOCIATION BETWEEN CARDIAC FUNCTION AND MYOFIBER ORGANIZATION   |  |    |
| IN THE AGING RODENT HEART .....                                     |  | 81 |
| 5.1   | INTRODUCTION .....   | 82 |
| 5.2   | METHODS.....   | 84 |
| 5.2.1   | MRI cardiac imaging .....  | 84 |
| 5.2.2   | Ex vivo tissue preparation.....                                  | 85 |
| 5.2.3   | Serial OCT imaging .....   | 85 |
| 5.2.4   | MRI data analysis.....   | 86 |
| 5.2.5   | OCT data analysis .....  | 86 |
| 5.3   | RESULTS .....  | 87 |
| 5.3.1   | Serial OCT images .....  | 87 |
| 5.3.2   | Age dependent changes in myocardial fiber organization .....     | 89 |
| 5.4   | DISCUSSION .....   | 94 |
| 5.5   | CONCLUSION .....   | 96 |
| 5.6   | REFERENCES .....   | 97 |

|                     |                                     |     |
|---------------------|-------------------------------------|-----|
| CHAPITRE 6          | DISCUSSION GÉNÉRALE .....           | 103 |
| 6.1                 | OBJECTIF 1 .....                    | 103 |
| 6.2                 | OBJECTIF 2 .....                    | 105 |
| 6.3                 | OBJECTIF 3 .....                    | 107 |
| CHAPITRE 7          | CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS ..... | 109 |
| BIBLIOGRAPHIE ..... |                                     | 110 |

## LISTE DES TABLEAUX

|   |    |
|---|----|
| Table 4.1 : Brain structure volumes with standard error measured with three different imaging modalities..... | 67 |
| Table 5.1 : Cardiac functional parameters of two aged groups .....  | 94 |

## LISTE DES FIGURES

|  |    |
|--|----|
| Figure 1.1 : Imagerie d'organes entiers .....                                    | 4  |
| Figure 1.2 : Transparence et imagerie d'organes intacts .....                    | 5  |
| Figure 2.1 : Méthodologie d'imagerie en microscopie tomographique sérielle ..... | 11 |
| Figure 2.2 : Interférogramme de Michelson .....                                  | 14 |
| Figure 2.3 : Ligne-A en OCT spectral .....                                       | 18 |
| Figure 2.4 : Longueur de cohérence .....   | 20 |
| Figure 2.5 : Faisceau gaussien au point focal .....                              | 22 |
| Figure 2.6 : Contraste OCT dans le tissu cervical de souris .....                | 26 |
| Figure 2.7 : Contraste OCT dans le tissu cardiaque de la souris .....            | 28 |
| Figure 3.1 : Montage OCT .....   | 30 |
| Figure 3.2 : Bras échantillon et bras de référence de l'OCT .....                | 32 |
| Figure 3.3 : Angle de déflexion des miroirs galvanométriques .....               | 35 |
| Figure 3.4 : Signaux générés pour les miroirs galvanométriques .....             | 37 |
| Figure 3.5 : Prétraitement de la ligne-A .....                                   | 38 |
| Figure 3.6 : Compensation de la dispersion .....                                 | 40 |
| Figure 3.7 : Résolution latérale du microscope .....                             | 41 |
| Figure 3.8 : Design du vibratome .....   | 43 |
| Figure 3.9 : Moule pour le bloc d'agarose .....                                  | 45 |
| Figure 3.10 : Plateforme d'imagerie combinant OCT et vibratome .....             | 47 |
| Figure 3.11 : Exemple de reconstruction 3D de jeux de données OCT .....          | 51 |
| Figure 4.1 : Serial scanner overview .....                                       | 57 |
| Figure 4.2 : Data processing workflow .....                                      | 61 |

|  |    |
|--|----|
| Figure 4.3 : OCT brain template .....  | 64 |
| Figure 4.4 : Warp field for slicer template to <i>in vivo</i> MRI template ..... | 65 |
| Figure 4.5 : Brain labeling .....  | 66 |
| Figure 4.6 : Cortical thickness .....  | 69 |
| Figure 4.7 : Collapsed ventricles .....  | 80 |
| Figure 5.1 : Heart reconstruction from serial OCT imaging.....                   | 88 |
| Figure 5.2 : Myofiber architecture .....   | 89 |
| Figure 5.3 : Age dependent changes in heart architecture .....                   | 90 |
| Figure 5.4 : Light attenuation.....  | 91 |
| Figure 5.5 : <i>In vivo</i> MRI heart imaging .....                              | 93 |

## LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

|       |   |
|-------|---|
| 2Ph   | Deux-photons  |
| AIP   | Projection d'intensité moyenne ( <i>Average Intensity Projection</i> )                        |
| ANTs  | <i>Advanced Normalization Tools</i>   |
| CO    | Débit cardiaque ( <i>Cardiac Output</i> )   |
| DC    | Courant Continu ( <i>Direct Current</i> )   |
| DFT   | Transformation de Fourier discrète ( <i>Discrete Fourier Transform</i> )                      |
| DTI   | Imagerie du tenseur de diffusion ( <i>Diffusion Tensor Imaging</i> )                          |
| ECG   | Électrocardiogramme   |
| ED    | Télédiastole ( <i>End Diastole</i> )  |
| EF    | Fraction d'éjection ( <i>Ejection Fraction</i> )  |
| ES    | Télésystole ( <i>End systole</i> )  |
| $f_x$ | Distance focale de la lentille x  |
| FA    | Fraction d'anisotropie ( <i>Fractional anisotropy</i> )                                       |
| FFT   | Transformation de Fourier Rapide ( <i>Fast Fourier Transform</i> )                            |
| FOV   | Champ de vue ( <i>Field Of View</i> )   |
| FWHM  | Largeur à mi-hauteur ( <i>Full Width at Half Maximum</i> )                                    |
| HR    | Fréquence cardiaque ( <i>Heart Rate</i> )   |
| IRM   | Imagerie par Résonance Magnétique   |
| LSFM  | Microscopie en fluorescence à nappe de lumière ( <i>Light Sheet Fluorescence Microscopy</i> ) |
| LV    | Ventricule gauche ( <i>Left Ventricle</i> )   |
| MRI   | Imagerie par Résonance Magnétique ( <i>Magnetic Resonance Imaging</i> )                       |

|           |  |
|-----------|--|
| NA        | Ouverture numérique ( <i>Numerical Aperture</i> )                                      |
| OCT       | Tomographie par cohérence optique ( <i>Optical Coherence Tomography</i> )              |
| ODF       | Fonction de distribution des orientations ( <i>Orientation Distribution Function</i> ) |
| PBS       | Tampon phosphate salin ( <i>Phosphate-Buffered Saline</i> )                            |
| PCIe      | <i>Peripheral Component Interconnect express</i>                                       |
| PFA       | Paraformaldéhyde   |
| PSF       | Fonction d'étalement du point ( <i>Point Spread Function</i> )                         |
| RF        | Fréquence radio ( <i>Radio Frequency</i> )   |
| SNR       | Rapport signal sur bruit ( <i>Signal-to-noise ratio</i> )                              |
| SS-OCT    | OCT à balayage spectrale ( <i>swept-source OCT</i> )                                   |
| TR        | Temps de Répétition  |
| TE        | Temps d'Écho   |
| TFISP     | <i>True Fast Imaging with Steady-state Precession</i>                                  |
| $\theta$  | Angle  |
| $\lambda$ | Longueur d'onde  |

## CHAPITRE 1 INTRODUCTION

### 1.1 Contexte et problématique

#### 1.1.1 Histologie conventionnelle

L'histologie est l'étude de la structure anatomique de cellules et de tissus provenant de plantes et d'animaux. Elle a fait ses débuts au cours du 17<sup>e</sup> siècle, mais ce n'est pas avant la fin du 19<sup>e</sup> siècle qu'on a vu l'apparition de l'histologie conventionnelle (Bracegirdle 1977), qui consiste en l'observation d'une fine couche de tissu déposée sur une lamelle de verre avec un microscope à champ clair. L'histologie est un outil de prédilection en biologie et en médecine et elle a donné lieu à de grandes découvertes, telles que l'élaboration du concept de neurone par Santiago Ramón Y Cajal, qui lui a valu le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1906 (López-Muñoz, Boya, and Alamo 2006). L'histopathologie est une autre branche de cette science qui consiste en l'étude de tissus malades et reste à ce jour l'étalon-or pour le diagnostic de nombreuses maladies telles que le cancer.

De nombreuses manipulations doivent être faites au tissu avant qu'on ne puisse l'imager au microscope, ce qui a pour résultat d'en modifier considérablement la nature. D'abord, le tissu doit être fixé pour éviter qu'il ne se décompose. Il existe de nombreux produits fixatifs qui permettent la préservation du tissu (Eltoum et al. 2001), dont le paraformaldéhyde (PFA) qui demeure le plus utilisé en histologie. Par la suite, le tissu doit être ancré dans une matrice de support mécanique pour le sectionnement. Un matériau sous forme liquide est utilisé pour s'incorporer autour de l'échantillon avant de subir un traitement (*eg* thermique, UV) pour devenir solide. Plusieurs matériaux peuvent être utilisés tels que l'agar, les résines d'époxy ou le silicone, mais la paraffine est le plus souvent utilisée comme matrice d'ancrage. Puisque la paraffine est hydrofuge, il faut déshydrater le tissu avant de l'ancrer dans le moule. La déshydratation se fait généralement en transférant progressivement l'échantillon dans des solutions d'éthanol de plus en plus concentrées. Plusieurs agents déshydratants, tels que l'éthanol, sont immiscibles avec la paraffine et l'échantillon doit donc être placé dans un agent solvant intermédiaire, tel que l'acétone, qui est miscible avec l'agent déshydratant et la paraffine. Alternativement, le tissu peut



aussi être congelé, le rendant ainsi très rigide pour faciliter le sectionnement. En histologie conventionnelle, la section de tissu doit être suffisamment mince ( $\sim 10 \mu\text{m}$ ) pour éviter d'imager des plans de tissu à l'extérieur de la région focale de l'objectif de microscope et pour que la lumière puisse passer à travers. De plus une mince section de tissu facilitera la diffusion des marqueurs histologiques dans le tissu. Le sectionnement du tissu se fait à l'aide d'un microtome, qui coupe de minces couches de tissus à l'aide d'une lame de rasoir fixe. Les tissus biologiques n'ont que très peu de contraste intrinsèque en microscopie à champ clair. Un marquage des coupes histologiques permet de générer un contraste dans le tissu, faisant ressortir des structures particulières. On distingue d'abord l'histochemie, qui permet d'induire un marquage des tissus en produisant une réaction entre des produits chimiques et le tissu. Il y a aussi l'immunohistochemie, qui permet de cibler spécifiquement des protéines dans le tissu via l'utilisation d'anticorps. Après le marquage histologique, les coupes de tissus sont déposées sur une lamelle de verre et sont prêtes pour imagerie.

Bien que l'histologie conventionnelle ait joué un rôle déterminant dans l'avancement de plusieurs pans de la science, celle-ci comporte des limites. D'abord, les nombreux traitements chimiques induits au tissu, tels que la déshydratation ou la congélation, peuvent provoquer des déformations (Yushkevich et al. 2006). Aussi, la procédure de préparation du tissu est dans la plupart des cas faite à la main, nécessitant de longues heures de travail manuel et un certain niveau d'expertise. Mais surtout, l'histologie conventionnelle ne donne qu'un aperçu minime et donc une très mauvaise représentation de l'organe en question. L'histologie sérielle et le développement d'outils automatiques pour obtenir de larges ensembles de données histologiques deviennent essentiels pour faire le pont entre la composition cellulaire à l'échelle microscopique et la morphologie de l'organe entier à l'échelle du centimètre.

### **1.1.2 Histologie sérielle**

L'augmentation exponentielle de la puissance de calcul des ordinateurs au cours des dernières décennies nous a permis de traiter plus d'informations qu'on n'aurait jamais cru possible lorsque l'histologie en était à ses débuts. Ces avancées ont profité à l'ensemble des domaines technologiques, dont l'histologie. Au cours des années 1990, des scanners de lamelles histologiques ont permis de produire des images digitales de coupes histologiques entières en

microscopie à champ clair ou en microscopie confocale (Pantanowitz et al. 2011). Un tel appareil permet l'acquisition automatique d'images et un visionnement facile de l'ensemble de la coupe, ce qui fut profitable tant aux histopathologistes qu'aux chercheurs (Pantanowitz 2010). Depuis leur apparition, les scanners de coupes entières ont évolué à un point tel qu'aujourd'hui, on est en mesure d'imager de grandes sections de tissus en seulement quelques minutes avec une résolution sous le micromètre (Moles Lopez et al. 2013) et avec la possibilité d'imager sur plusieurs plans pour les sections épaisses (Hamamatsu Photonics 2014).

Plus récemment, ces techniques ont été utilisées par les chercheurs pour reconstruire des organes entiers en recollant ensemble des coupes histologiques digitales. Le *Big Brain initiative* (Amunts et al. 2013) a permis de reconstruire un cerveau humain en entier en acquérant un total de 7400 coupes histologiques de 20  $\mu\text{m}$  d'épaisseur en images de 13 000 x 11 000 pixels, résultant en un jeu de données de 1 téraoctet (To). Ce jeu de données représente une avancée majeure pour créer un atlas précis du cerveau humain, passant d'une résolution de l'ordre du millimètre avec l'IRM, comparativement à une résolution quasi cellulaire de 20  $\mu\text{m}$ . Toutefois ce travail ne fut pas trivial : chaque coupe devait être manuellement placée sur une lamelle de verre pour l'imager (Figure 1.1.A). Par la suite, un opérateur était requis pour corriger manuellement les coupes endommagées par le tranchage. L'acquisition d'un seul cerveau a nécessité pas moins de 1000 heures de travail.

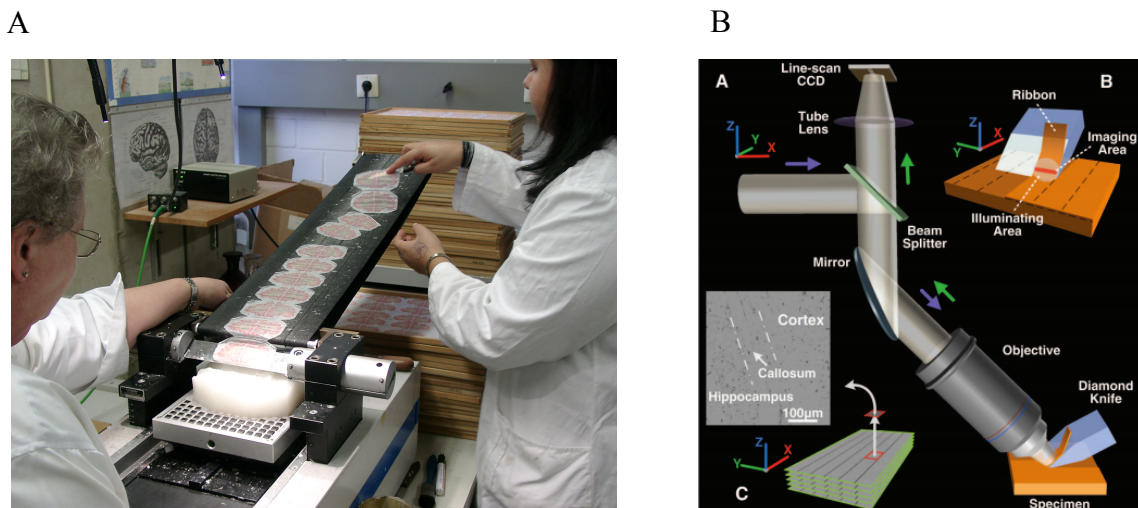


Figure 1.1 : Imagerie d'organes entiers. A : Le *Big Brain initiative* (adapté de Amunts et al. 2013) nécessitait un travail manuel pour le sectionnement d'un cerveau humain ancré dans la paraffine. B : Schéma d'acquisition d'un cerveau de souris avec la technique MOST (adaptée de Li et al. 2010).

Des outils automatiques ont permis de surmonter ce besoin d'un opérateur, réduisant du coup le temps d'acquisition. Le MOST (*Micro-optical sectioning tomography*) a été proposé pour imager des cerveaux de souris entiers (A. Li et al. 2010). MOST consiste à imager avec un grossissement de 40x des rubans de tissu larges de 450  $\mu\text{m}$  et d'une épaisseur de 1  $\mu\text{m}$  au fur et à mesure qu'ils sont coupés au microtome (Figure 1.1.B), produisant 8 To de données avec une taille de voxel de 0,33 x 0,33 x 1  $\mu\text{m}$ . Ces résultats impressionnants ont donné naissance à une matrice tridimensionnelle conforme à l'atlas de Franklin et Paxinos (Franklin 2013), largement utilisée pour le cerveau de souris.

Bien que ces techniques soient d'importantes avancées pour faire le pont entre la microscopie à l'échelle micrométrique et l'imagerie d'organes entiers à l'échelle du centimètre, elles comprennent aussi des limitations. En effet, elles se basent sur l'imagerie de sections de tissu coupées. Le sectionnement mène à une déformation ainsi qu'à une perte de tissu dans l'axe transversal au mouvement de la lame de coupe, rendant difficile la récupération de la topologie tridimensionnelle. De plus, le sous-échantillonnage en profondeur, typiquement résultant en une résolution égale à l'épaisseur de la coupe, rend difficile la bonne représentation de l'échantillon en trois dimensions.

Pour pallier au problème du sectionnement, des techniques pour clarifier le tissu ont été développées (Costantini et al. 2015; Kim, Chung, and Deisseroth 2013; Chung et al. 2013; Ertürk et al. 2012). Le but ici est de réduire les inhomogénéités dans le tissu en supprimant les lipides et en uniformisant l'indice de réfraction pour produire un échantillon translucide (Figure 1.2.B) (Aswendt et al. 2017). Ces procédés chimiques rendent le tissu transparent tout en laissant les protéines et les acides nucléiques intacts pour le marquage histologique et la microscopie en fluorescence. Pour imager ces gros échantillons, on préconise la microscopie en fluorescence à nappe de lumière (*Light Sheet Fluorescence Microscopy*, LSFM) (Tomer et al. 2014; Schwarz et al. 2015; Dodt et al. 2007), qui est considérablement plus rapide que le balayage laser dans l'échantillon. Le LSFM consiste en l'illumination du plan focal de l'objectif en entier, en focalisant un faisceau laser avec une lentille cylindrique (Figure 1.2.C). Les fluorophores situés dans ce plan d'illumination émettront de la lumière collectée dans l'objectif et captée par un détecteur en champ plein, soit CCD ou CMOS. En acquérant tout le plan focal d'un coup on réduit grandement le temps d'acquisition.

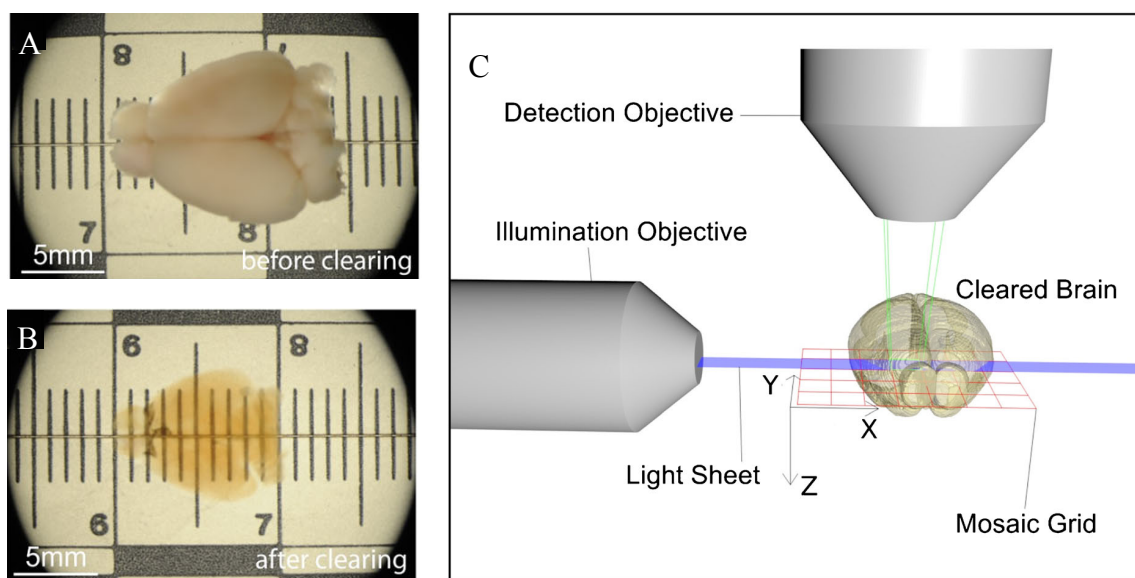


Figure 1.2 : Transparence et imagerie d'organes intacts. A : Représentation d'un cerveau de souris perfusé dans le PFA. B : Le même cerveau qu'en A après la technique de transparence BABB (Dodt et al. 2007). C : Schématisation de la LSFM. Adaptée de Aswendt et al. 2017.

En microscopie à nappe de lumière, l'objectif de microscope doit avoir une longue distance de travail. Effectivement, pour être en mesure d'imager un échantillon d'une épaisseur de l'ordre du centimètre, tel qu'un organe de souris, on doit être en mesure de placer le plan focal en profondeur dans le tissu. La nécessité d'avoir une longue distance de travail limite l'ouverture numérique (NA) de l'objectif de détection et limite donc le grossissement qu'on peut obtenir. Aussi, la qualité des images en LSM dépend fortement de la feuille d'illumination qui se trouve directement dans le plan focal de l'objectif. Tout désalignement des deux plans aura pour conséquence de réduire la résolution de l'image. Or, dû aux changements d'indices de réfraction résiduels dans le tissu clarifié, la distance de travail de l'objectif de détection peut changer. Ceci rend difficile le maintien de l'illumination dans le plan focal de l'objectif de détection, menant à une perte de signal (Huisken and Stainier 2007; Richardson and Lichtman 2015). Enfin, les techniques de transparence ne sont pas sans leur lot de difficultés. Certaines techniques de transparence peuvent induire des déformations importantes, changeant significativement la morphologie du tissu (Becker et al. 2012). De plus, le processus de transparence peut fortement affecter les fluorophores présents dans l'échantillon, affectant ainsi le signal en fluorescence (Ertürk et al. 2012).

Dans ce projet, une autre technique pour l'histologie massive, appelée la microscopie tomographique sérielle a été privilégiée. La microscopie tomographique sérielle, décrite en détail au chapitre 2, consiste à séquentiellement imager des sections de tissu exposées grâce à une lame de rasoir vibrante. Une revue de la littérature montrera que ces imageurs peuvent faire ressortir une multitude de contrastes dans les tissus en utilisant diverses techniques et modalités d'imagerie, tout en obtenant une résolution spatiale sous le micron. Ici, la tomographie par cohérence optique (OCT) a été choisi pour imager le signal rétro-diffusé dans le tissu.

## 1.2 Objectifs

À ce jour, déjà beaucoup de travaux ont été réalisés avec les microscopes tomographiques sériels. La majorité des publications employant ces imageurs sériels font état d'une preuve de concept. Peu de travaux ont été réalisés dans lesquels un imageur tomographique sériel est utilisé pour faire une étude de groupe. Ces imageurs couplent les avantages de l'histologie, à savoir la

résolution micrométrique, et les avantages de l'IRM, soit l'imagerie d'un organe entier non déformé. L'utilisation d'un microscope tomographique sériel dans l'étude d'une pathologie a le potentiel de mettre en valeur des changements microscopiques dans un organe en entier. Toutefois, dû au long temps d'acquisition et à la quantité massive de données accumulées, la réalisation d'études de groupes demeure un défi. Dans le cadre de ce doctorat, c'est précisément ce qui sera fait : un microscope tomographie sériel combiné à un OCT a été développé pour imager le contraste natif des tissus. Ce projet doctoral se subdivise en trois objectifs majeurs.

### ***Objectif 1***

Le premier objectif découlant de ce projet est de reproduire un imageur sériel OCT, capable d'imager un échantillon de l'ordre du  $\text{cm}^3$ , ayant pour finalité d'imager un grand nombre de tissus. La conception de ce système est décrite au chapitre 3. Cet objectif consistait à mettre en place une technologie qui a permis de générer des données pour les travaux suivants :

Lefebvre, Joël, Alexandre Castonguay, Philippe Pouliot, Maxime Descoteaux, Frédéric Lesage. "Whole mouse brain imaging using OCT: Reconstruction, normalization, segmentation and comparison to diffusion MRI". *Three-Dimensional and Multidimensional Microscopy: Image Acquisition and Processing XXIV*. SPIE, 2017.

Guevara, Edgar, Jose Manuel Gutierrez-Hernandez, Alexandre Castonguay, Frédéric Lesage, Benjamín Moncada, Francisco Javier González (2017) "Morphological and molecular imaging of skin samples." *Biomedical Research* 28 (4) pp. 1664–1669.

Tardif, Pier-Luc, Marie-Jeanne Bertrand, Maxime Abran, Alexandre Castonguay, Joël Lefebvre, Barbara Stähli, Nolwenn Merlet, et al. 2016. "Validating Intravascular Imaging with Serial Optical Coherence Tomography and Confocal Fluorescence Microscopy." *International Journal of Molecular Sciences* 17 (12): 2110. doi:10.3390/ijms17122110.

Lesage, F., A. Castonguay, P. L. Tardif, J. Lefebvre, and B. Li. “Investigating the Impact of Blood Pressure Increase to the Brain Using High Resolution Serial Histology and Image Processing.” edited by Manos Papadakis, Vivek K. Goyal, and Dimitri Van De Ville, 95970M, 2015. doi:10.1117/12.2189110.

### ***Objectif 2***

Avec la possibilité de reproduire à l'échelle microscopique des organes entiers, il y a un intérêt pour corréler ces jeux de données aux images IRM pour la première fois, répondant à des questions jusqu'à maintenant inaccessibles. Une validation reste cependant à faire pour s'assurer que le tranchage ne déforme pas de façon significative le tissu. Par ailleurs, la fixation du tissu est connue pour introduire des déformations qui dépendent fortement de la procédure employée, la durée de la fixation et de la déshydratation (Wehrl et al. 2015; Weisbecker 2012; Quester and Schröder 1997). Avant de pouvoir corréler les images du trancheur avec les images IRM in vivo, une évaluation des déformations du tranchage et de la fixation doit être faite.

Le second objectif est donc de quantifier les déformations introduites dans un tissu imagé en microscopie tomographique sérielle et imageant un groupe de cerveaux de souris, puis de les comparer aux données IRM. Cet objectif a mené à la soumission de l'article suivant, présenté au chapitre 4 :

Castonguay, Alexandre, Joël Lefebvre, Philippe Pouliot, Frédéric Lesage. “Comparing 3D serial OCT histology to MRI imaging in the entire mouse brain”. Article soumis à *Journal of Biomedical Optics*. 2017.

### ***Objectif 3***

Avec la capacité d'imager à haute résolution des organes en entier, le système d'imagerie a été utilisé pour étudier le vieillissement du cœur chez la souris saine. Il est bien établi que le vieillissement est associé avec des changements fonctionnels du cœur chez l'humain (Swinne et al. 1992; Schulman et al. 1992) et que l'organisation du myocarde y joue un rôle clé (D. D. Streeter et al. 1969; Taccardi et al. 1994).

Le troisième objectif de cette thèse est de comparer la morphologie et l'architecture du myocarde chez les souris jeunes et âgées. La fonction cardiaque de ces mêmes cœurs a été imagée pour tenter d'établir un lien entre les changements structurels et fonctionnels. Cette étude a permis de soumettre l'article suivant, présenté au chapitre 5 :

Castonguay, Alexandre, Joël Lefebvre, Philippe Pouliot, Pramod Avti, Mohammad Moeini, Frédéric Lesage. "Serial optical coherence tomography reveals an association between cardiac function and myofiber organization in the aging rodent heart". Article soumis à *Biomedical Optics Express*. 2017



## CHAPITRE 2 REVUE DE LITTÉRATURE

### 2.1 Microscopie tomographique sérielle

La microscopie tomographique sérielle combine l'imagerie en face sur bloc (*block-face imaging*) et le sectionnement du tissu (Ragan et al. 2007, 2012; Amato et al. 2016). L'imagerie en face sur bloc consiste à retirer de l'échantillon une section de tissu et d'imager la surface nouvellement exposée de l'échantillon (Odgaard et al. 1990) (Figure 2.1). L'imagerie bloque-face a été adaptée pour des techniques d'imagerie microscopique avec résolution en profondeur, tel que la microscopie deux-photons (2Ph) (Philbert S. Tsai et al. 2003; Ragan et al. 2007) et la tomographie par cohérence optique (OCT) (H. Wang, Zhu, and Akkin 2014; H. Wang et al. 2011). Ces techniques utilisent des longueurs d'ondes dans le proche infrarouge qui permettent d'imager en profondeur dans le tissu (Smith, Mancini, and Nie 2009; Jacques 2013). Il est donc possible d'imager à plusieurs dizaines de micromètres sous la surface et non la surface elle-même, résultant en un tissu imagé dans son état d'origine, n'ayant pas subi de déformation due au tranchage.

En coupant puis en imageant séquentiellement chaque section exposée, on arrive à imager des organes de petits animaux en entier. En utilisant des techniques d'imagerie avec résolution en profondeur, la résolution axiale n'est plus déterminée par l'épaisseur de la coupe, mais plutôt par la résolution axiale de la modalité d'imagerie. Pour chaque section de tissu, on image donc plusieurs plans axiaux. Après avoir imagé l'entièreté de la section, on retire mécaniquement une coupe en surface, mais à une profondeur moindre que ce qui a été imagé, laissant donc un chevauchement entre les coupes successives (Figure 2.1). Le volume suivant sera donc superposé avec le précédent, sans interstice, pour former un organe reconstruit sans discontinuité.

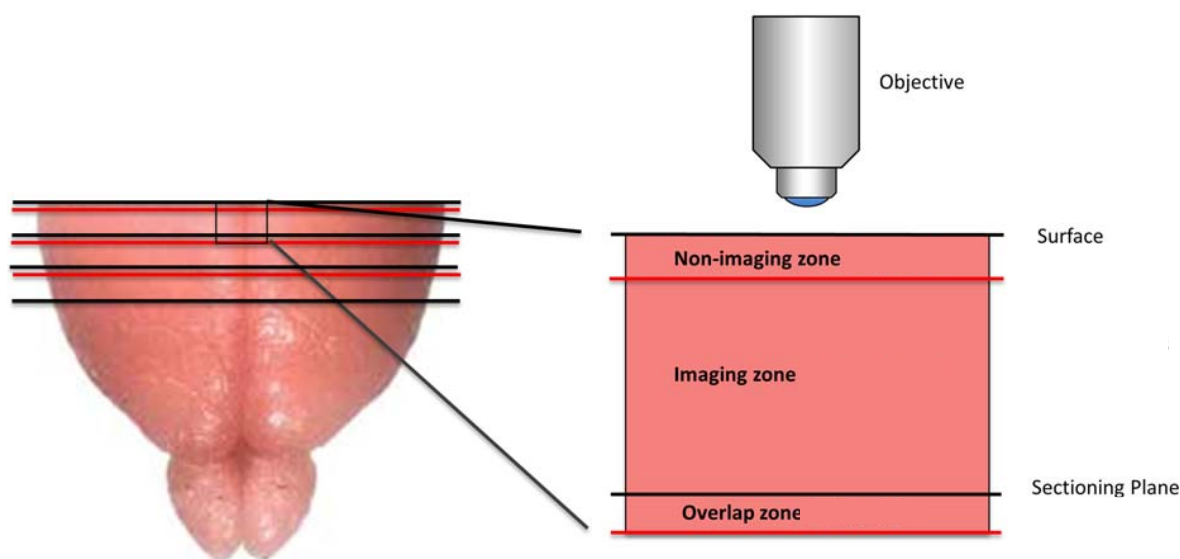


Figure 1.3 : Méthodologie d'imagerie en microscopie tomographique sérielle. La partie supérieure de l'échantillon est retirée à l'aide d'un vibratome pour exposer une nouvelle surface. La zone d'imagerie de la section nouvellement exposée est définie par les lignes rouges, laissant une région en surface non imagée. La coupe subséquente se fait à l'intérieur de la zone d'imagerie pour ainsi ne perdre aucun tissu. Adaptée de Amato et al. 2016.

Tout ce processus étant automatisé, il est possible d'imager rapidement au travers de larges volumes de tissus sans intervention humaine. En principe, il n'y a pas de limite physique quant à la taille de l'échantillon imagé. En pratique, la taille du jeu de données ainsi que le temps d'acquisition vont influencer sur la taille de l'échantillon à imager et l'échantillonnage. Par exemple, imager un cerveau de souris à une résolution de l'ordre du micromètre peut prendre jusqu'à 7 jours et occuper plus de 10 To (Gong et al. 2016; Ragan et al. 2012).

Un aspect important de cette technique est qu'il n'y a plus besoin d'avoir des coupes excessivement fines. En effet, en utilisant des sources lumineuses dans le proche infrarouge, il est possible d'imager jusqu'à quelques centaines de micromètres en profondeur (H. Wang, Zhu, and Akkin 2014). Au lieu de couper le tissu aux 5-10  $\mu\text{m}$ , comme en histologie conventionnelle, on peut séparer les coupes de plusieurs dizaines, voir quelques centaines de micromètres. On préconise ici le sectionnement à l'aide d'une lame vibrante, appelée vibratome. Contrairement au microtome, l'utilisation d'un vibratome permet de couper des tissus mous. Ainsi, les procédures de traitement du tissu requis pour le microtome, telles que la déshydratation, l'ancrage dans la paraffine ou la congélation ne sont plus requises. Plutôt, l'échantillon est ancré dans une matrice

d'agarose (Sallee and Russell 1993). Ce faisant, le tissu ne subit que la fixation pour le préserver, limitant les traitements chimiques dommageables.

Plusieurs modalités d'imagerie peuvent être utilisées avec un microscope tomographique sériel, mais la plus utilisée demeure l'imagerie 2Ph en fluorescence. La nature non linéaire de l'imagerie 2Ph offre un très bon sectionnement axial (Denk, Strickler, and Webb 1990). Puisque la majorité des fluorophores utilisés comme biomarqueurs sont excitables dans le visible, l'illumination 2Ph se trouve dans le proche infrarouge (Xu and Webb 1996), donnant une bonne profondeur de pénétration dans les tissus biologiques. Contrairement à l'histologie conventionnelle, le marquage du tissu avec les techniques histochimiques traditionnelles n'est pas possible. Le marquage histologique se fait sur des coupes très minces sur une période de plusieurs heures, ce qui n'est pas possible avec l'imagerie en face sur bloc, où la diffusion des marqueurs dans le tissu épais prendrait un temps excessif et sera non uniformément distribué. Un groupe a démontré qu'il était possible de submerger le tissu dans une solution contenant de l'iodure de propidium pour marquer la cytoarchitecture à la surface à imager (Gong et al. 2016). Par contre, les marqueurs qui ne pénètrent pas rapidement dans le tissu pour permettre un marquage en temps réel et le coût souvent très élevé des marqueurs histologiques limitent fortement cette technique. Plutôt, le signal en fluorescence provient majoritairement de l'utilisation de modèles animaux transgéniques (Vousden et al. 2015; Amato et al. 2016), ou via l'injection de vecteurs viraux (Oh et al. 2014; Economo et al. 2016). D'autres techniques, telles que la perfusion de l'animal avec une gélatine fluorescente permet d'imager en trois dimensions la microvasculature du cerveau (Amato et al. 2016) (P. S. Tsai et al. 2009).

La microscopie tomographique sérielle peut aussi imager le contraste natif dans le tissu, sans faire appel à des marqueurs. Par exemple, l'auto fluorescence du tissu en microscopie deux-photons peut donner de l'information structurelle sur le tissu. À cet effet, l'atlas Allen (Oh et al. 2014; Sunkin et al. 2013; Kuan et al. 2015) a été créé en moyennant 1675 cerveaux de souris imagés avec des microscopes tomographiques sériels. Le cerveau Allen est résolu à 10µm et subdivisé en plus de 1000 régions anatomiques. Dans cet atlas anatomique, les régions contenant une plus faible densité cellulaire ou avec de petits corps cellulaires, tel que dans les fibres de matière blanche apparaissent plus sombres. D'autre part, l'imagerie par diffusion Raman anti-Stokes cohérente (CARS) peut aussi être utilisée en microscopie sérielle, faisant ressortir diverses structures dans le cerveau tel que les axones myélinisés (Fu et al. 2008; Evans et al. 2007),

Dans le cadre de ce projet, une autre technique pour imager le contraste intrinsèque dans les tissus biologiques a été utilisée : la tomographie par cohérence optique (OCT). En effet, le contraste en OCT est sensible aux changements d'indices de réfraction dans le tissu. Dans la section suivante seront détaillés les principes de bases derrière cette technique d'imagerie volumétrique, ainsi que l'origine du signal émanant de la tomographie par cohérence optique.

## **2.2 Microscopie à tomographie par cohérence optique**

### **2.2.1 Théorie**

La tomographie par cohérence optique (OCT) a été introduite comme technique d'imagerie des tissus biologiques avec résolution en profondeur (Huang et al. 1991). Cette technique s'apparente à l'échographie où on mesure le signal réfléchi sur les couches successives de tissus. En OCT, la lumière voyage beaucoup plus rapidement qu'une onde acoustique, rendant impossible la mesure d'un retard de quelques millimètres. Pour pallier ceci, on utilise plutôt une technique d'interférométrie. En utilisant une source lumineuse avec une faible longueur de cohérence, la lumière réfléchie sur l'échantillon interférera constructivement avec la lumière du bras de référence lorsque la différence de marche entre les deux bras sera inférieure à la longueur de cohérence de la source.

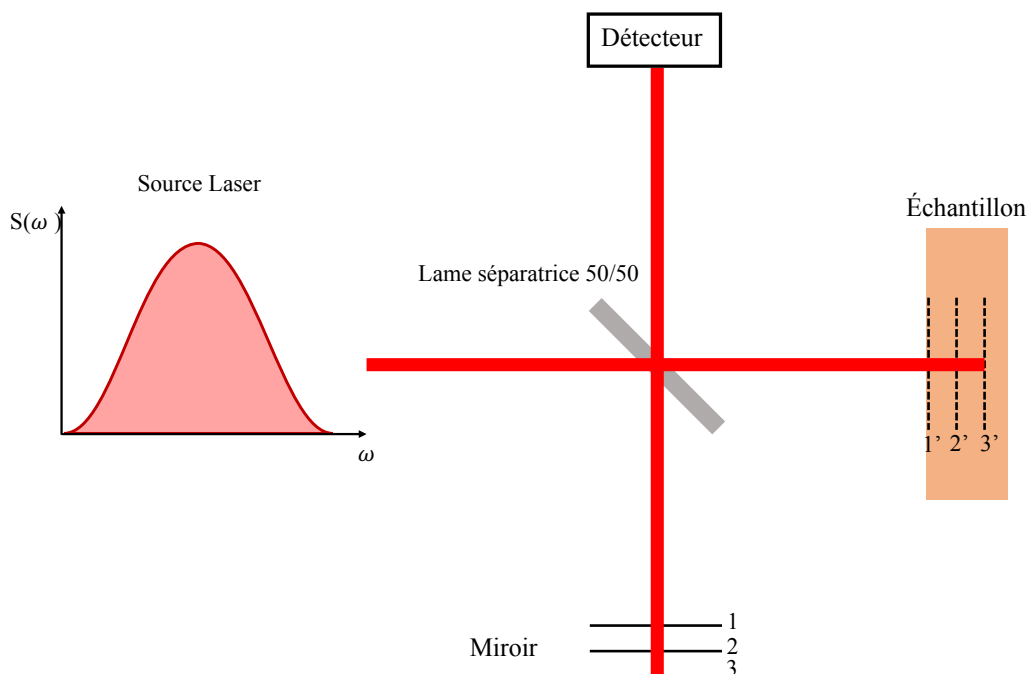


Figure 1.4 : Interférogramme de Michelson. La source lumineuse de faible cohérence est séparée par une lame séparatrice pour illuminer l'échantillon et un miroir de référence. Dû à la faible longueur de cohérence du faisceau, l'interférence pour les différents réflecteurs dans l'échantillon ne se produira qu'à des positions précises du miroir.

Avec les premiers OCT, pour mesurer le signal provenant de différentes profondeurs, on plaçait le miroir de référence sur une platine de déplacement linéaire pour faire varier la longueur du bras de référence (Figure 2.2). Le balayage du miroir de référence sur une distance  $Z$  permet d'acquérir l'information sur une colonne dans l'échantillon. Un OCT avec balayage mécanique du miroir de référence s'appelle un OCT dans le domaine temporel. L'information sur une colonne en profondeur s'appelle une ligne-A. Dans un microscope, l'acquisition d'un volume OCT se fait en balayant le laser dans les directions transverses à l'axe optique à l'aide de miroirs galvanométriques. Ces deux autres dimensions forment les lignes-B et C.

Pour l'OCT dans le domaine temporel, la vitesse d'acquisition des images est limitée par le mouvement lent du miroir de référence. Des avancées ont permis d'obtenir des vitesses d'acquisition allant jusqu'à 2000 lignes-A par seconde (Tearney, Bouma, and Fujimoto 1997). Dans le domaine temporel, il y a toutefois un compromis à faire entre la vitesse d'acquisition et la sensibilité de détection. En effet, chaque diffuseur est échantillonné pendant un temps égal au

temps d'acquisition de la ligne-A divisé par le nombre de points compris dans la ligne-A. Donc, plus on balaie rapidement, plus la sensibilité diminue.

Plus récemment, l'OCT dans le domaine spectral a permis d'outrepasser les difficultés de l'OCT temporel. L'OCT spectral est basé sur un interférogramme avec un bras de référence fixe, où l'information en profondeur est encodée dans la longueur d'onde. On distingue deux types d'OCT spectral : celui basé sur une source à balayage (Yun et al. 2003) et celui basé sur un spectromètre (Wojtkowski et al. 2002). En passant dans le domaine spectral, l'information de tous les diffuseurs est acquise simultanément, augmentant la sensibilité de détection. Aussi, dû à l'absence d'un mouvement mécanique du miroir de référence, on est en mesure d'atteindre des vitesses d'acquisitions bien supérieures.

### 2.2.1.1 Origine du signal en OCT spectral

Pour comprendre l'origine du signal d'interférence dans le domaine spectral, il faut considérer les champs électriques provenant des deux bras de l'interféromètre. Le champ électrique ( $E$ ) provenant du bras de référence ( $R$ ) varie en fonction de la fréquence angulaire du spectre selon:

$$E_R(\omega) = E_0(\omega)r_R e^{i(2k_R(\omega)z_R - \omega t)} \quad (2.1)$$

où  $E_0(\omega)$  est le champ électrique de la source qui varie en fonction de la fréquence angulaire ( $\omega$ ),  $r_R$  est la réflectivité du miroir,  $k_R(\omega)$  est le nombre d'onde dans le bras de référence et  $z_R$  la distance parcourue dans le bras de référence.

Pour le champ électrique dans le bras échantillon ( $S$ ), il faut considérer le signal provenant de tous les diffuseurs simultanément :

$$E_S(\omega) = E_0(\omega) \int_{-\infty}^{+\infty} r_S(z_S) e^{i(2k_S(\omega)z_S - \omega t)} dl_S \quad (2.2)$$

où  $r_S(z_S)$  est la réflectivité d'un diffuseur à la profondeur  $z_S$ .

En négligeant la dispersion de la lumière dans l'échantillon :

$$\frac{k_R}{n_R} = \frac{k_S}{n_S} = k = \frac{\omega}{c} \quad (2.3)$$

où  $n_R$  et  $n_S$  sont les indices de réfraction du milieu dans lequel se trouve le miroir et l'indice de réfraction moyen de l'échantillon, respectivement. On peut donc exprimer le champ électrique en fonction du nombre d'onde  $k$ .

Dans un interféromètre de Michelson, le courant mesuré au détecteur est donné par :

$$I(k) = \frac{\eta e}{h\nu} \frac{|E_R + E_S|^2}{2Z_0} \propto |E_R(kc) + E_S(kc)|^2 \quad (2.4)$$

où  $\eta$  est l'efficacité quantique du détecteur,  $e$  la charge de l'électron,  $h\nu$  l'énergie du photon et  $Z_0$  l'impédance du vide. En négligeant les constantes, l'interférogramme mesuré est proportionnel à  $E_R$  et  $E_S$ .

En insérant l'équation (2.1) et (2.2) dans (2.4) :

$$\begin{aligned} I(k) &= S(k)r_R^2 \\ &+ 2S(k)r_R \int_{-\infty}^{+\infty} r_s(z_S) \cos(2k(n_S z_S - z_R)) dz_S \\ &+ S(k) \left| \int_{-\infty}^{+\infty} r_s(z_S) e^{i2kn_S z_S} dz_S \right|^2 \end{aligned} \quad (2.5)$$

où  $S(k) = |E_0(kc)|^2$  est la puissance spectrale de la source.

On distingue ici trois composantes dans le photo-courant mesuré par le détecteur. Le premier terme représente le signal réfléchi sur le miroir de référence. C'est le signal dominant lu par le détecteur si la réflectivité du miroir de référence domine la réflectivité de l'échantillon et il ne représente pas un signal d'interférence. En pratique, pour négliger ce signal DC, on utilise un photo-détecteur équilibré qui ne mesure que les variations de courant. Le second terme représente l'interférence entre l'échantillon et le miroir qui dépend de la puissance de la source et de la différence de pas entre le miroir et le réflecteur. C'est le signal d'intérêt en OCT. Enfin, le troisième terme est causé par l'auto-interférence entre les différents réflecteurs dans l'échantillon. Ce signal apparaît comme un artéfact en OCT mais comme il n'y a aucune dépendance selon la

réflectivité du miroir qui est bien supérieure à celle des tissus biologiques, il est beaucoup plus faible.

On peut donc réécrire le signal d'intérêt en OCT comme :

$$\begin{aligned}
 I(k) &= 2S(k)r_R \int_{-\infty}^{+\infty} r_s(z_s) \cos(2k(n_s z_s - z_R)) dz_s \\
 &= 2S(k)r_R \sum_{m=1}^M r_{sm} \cos[2k(n_s z_s - z_R)]
 \end{aligned} \tag{2.6}$$

où  $m$  est le point échantillonné en profondeur,  $M$  le nombre total de points à échantillonner et  $r_{sm}$  est la réflectivité de l'échantillon à une profondeur  $m$ .

En prenant la transformée de Fourier, on obtient une ligne-A :

$$i(z) = r_R \sum_{m=1}^M r_{sm} \{ \gamma(z)[2(n_s z_s - z_R)] + \gamma(z)[-2(n_s z_s - z_R)] \} \tag{2.7}$$

où le terme  $\gamma$  provient de la transformée de Fourier du spectre  $S(k)$  qui est définie comme la fonction de cohérence de la source et aura comme impact d'évaser le réflecteur (Figure 2.3). On note que la position apparente du réflecteur par rapport à la référence est doublée dans l'interférogramme dû au parcours aller-retour de la lumière. Une image miroir du réflecteur apparaît à  $-2z$  dû au second terme dans l'équation (2.7).



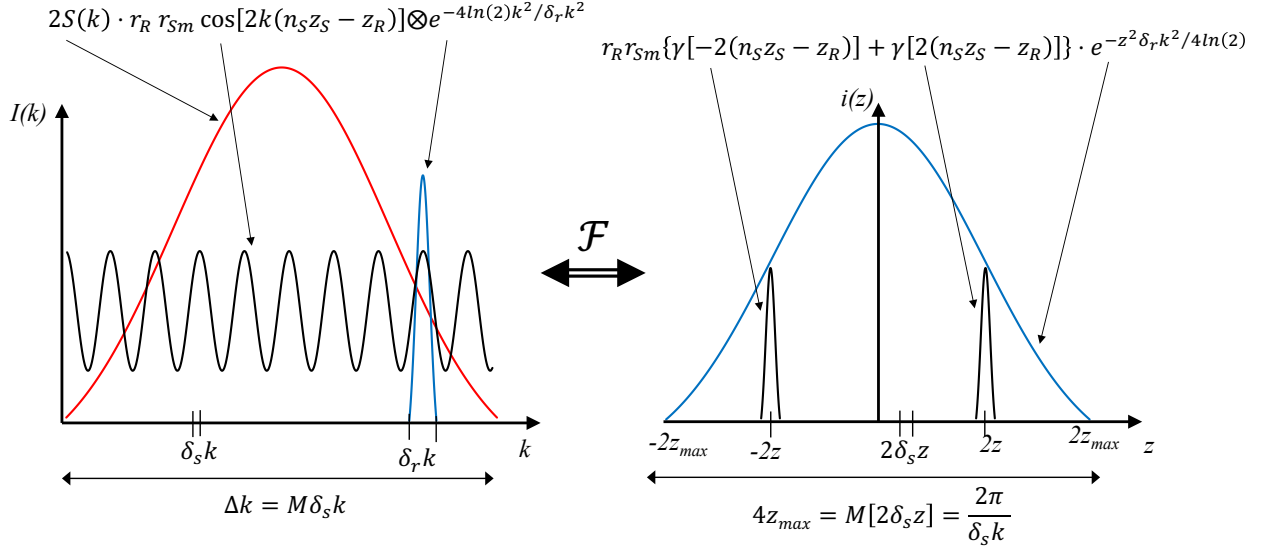


Figure 1.5 : Ligne-A en OCT spectral. Gauche : Le signal provenant d'un unique réflecteur (noir) dans l'échantillon est modulé par le spectre de la source (rouge). Ce signal est convolué par la résolution spectrale de la détection (bleu). Droite : la transformé de Fourier du signal fait apparaître le réflecteur à une distance  $2z$ . Un artéfact de l'image miroir apparaît à  $-2z$ , tel que décrit dans l'équation (2.7). La sensibilité est réduite en s'éloignant de la différence de pas nulle due à la limite de résolution de détection (bleu).

En pratique, l'acquisition de l'interférogramme spectral est limitée par la résolution spectrale de la source, dénommée  $\delta_r k$  (Figure 2.3). En OCT à balayage spectral,  $\delta_r k$  est limité par le profil instantané de la source laser. En convoluant le signal de l'interférogramme spectral de l'équation (2.6) par une fonction gaussienne ayant une largeur à mi-hauteur de  $\delta_r k$  représentant la résolution spectrale de la source, on obtient une perte de sensibilité lorsqu'on s'éloigne de la différence de marche nulle (Figure 2.3) tel que :

$$\mathcal{F}\{I(k) \otimes e^{-4\ln(2)k^2/\delta_r k^2}\} = i(z)e^{-z^2 \delta_r k^2 / 4\ln(2)} \quad (2.8)$$

Un autre aspect pratique à considérer est l'échantillonnage du spectre. L'interférogramme est échantillonné sur  $M$  points linéairement espacés par  $\delta_s k$  (Figure 2.3). La plage d'échantillonnage du nombre d'onde est donc :

$$\Delta k = M\delta_s k \quad (2.9)$$

Ceci se convertit comme un intervalle d'échantillonnage dans l'espace  $z$  de :

$$2\delta_s z = \frac{2\pi}{\Delta k} \quad (2.10)$$

où le facteur 2 provient du parcours aller-retour de la lumière (Figure 2.3). Ainsi, la profondeur d'imagerie d'un OCT est définie par :

$$4z_{max} = M[2\delta_s z] = \frac{2\pi M}{M\delta_s k} \quad (2.11)$$

$$z_{max} = \frac{\pi}{2\delta_s k} \quad (2.12)$$

Les sources laser à balayage sont généralement décrites en fonction de la longueur d'onde. Le nombre d'onde est relié à la longueur d'onde par :

$$k = \frac{2\pi}{\lambda} \quad (2.13)$$

Le changement du nombre d'onde ( $\delta k$ ) s'écrit par :

$$\delta k = 2\pi \left( \frac{1}{\lambda_0 - \delta\lambda/2} - \frac{1}{\lambda_0 + \delta\lambda/2} \right) = \frac{8\pi\delta\lambda}{4\lambda_0^2 - \delta\lambda^2} \quad (2.14)$$

Puisque  $\lambda_0 \gg \delta\lambda$  on peut affirmer :

$$\delta k \approx \frac{2\pi\delta\lambda}{\lambda_0^2} \quad (2.15)$$

Ainsi, la profondeur d'imagerie est dépendante de la longueur d'onde selon :

$$z_{max} = \frac{\lambda_0^2}{4\delta_s \lambda} \quad (2.16)$$

où  $\delta_s \lambda$  est l'intervalle d'échantillonnage mesuré en unités de longueur d'onde.

### 2.2.1.2 Résolution axiale

Tel que décrit dans l'équation (2.7), la résolution d'un réflecteur est déterminée par la fonction de cohérence  $\gamma(z)$  qui dépend du spectre de la source. Généralement, on considère une source ayant un spectre gaussien. Ce spectre peut être décrit comme :

$$S(k) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma_k^2}} e^{-(k-k_0)^2/2\sigma_k^2} \quad (2.17)$$

où  $k_0$  est le nombre d'onde central de la source et  $\sigma_k$  est la variance du spectre gaussien. Le théorème de Wiener-Kinchin relie la densité spectrale de la source à la fonction de cohérence par une transformée de Fourier (Figure 2.4) :

$$\gamma(z) = \mathcal{F}\{S(k)\} = e^{-\sigma_k^2 z^2/2} \quad (2.18)$$

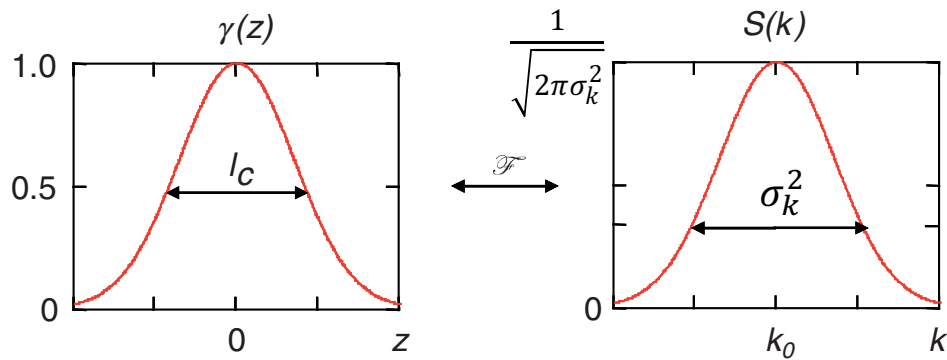


Figure 1.6 : Longueur de cohérence. Illustration de la fonction de cohérence (caractérisé par une longueur de cohérence  $l_c$ ) reliée à la densité spectrale de la source par une transformée de Fourier. Adaptée de (Drexler and Fujimoto 2008).

La largeur à mi-hauteur (FWHM) de la fonction de cohérence (Figure 2.4), appelée la longueur de cohérence, définit la résolution axiale d'un OCT. Cette longueur de cohérence est entièrement dépendante du spectre de la source.

L'équation (2.18) montre qu'une transformée de Fourier d'une gaussienne donne aussi une fonction de cohérence gaussienne, avec une variance égale à:

$$\sigma_z^2 = \frac{1}{\sigma_k^2} \quad (2.19)$$

On peut relier le FWHM spectral de la source à la variance  $\sigma_k^2$  selon :

$$S(k_0 + \Delta k_{FWHM}/2) = S(k_0)/2 \quad \Rightarrow \quad \Delta k_{FWHM}^2 = 8\ln(2)\sigma_k^2 \quad (2.20)$$

De façon similaire, on peut trouver la longueur de cohérence ( $l_C$  ou  $\Delta z_{FWHM}$ ) en fonction de la variance du spectre :

$$\gamma(\Delta z_{FWHM}/2) = \gamma(0)/2 \quad \Rightarrow \quad \Delta z_{FWHM}^2 = \frac{8\ln(2)}{\sigma_k^2} \quad (2.21)$$

Avec les équations (2.20) et (2.21), on a :

$$\Delta z_{FWHM} = \frac{1}{2} \frac{8\ln(2)}{\Delta k_{FWHM}} = \frac{4\ln(2)}{\Delta k_{FWHM}} \quad (2.22)$$

où le facteur 1/2 apparaît alors qu'on convertit un parcours optique dans le bras d'interférence à une profondeur physique dans l'échantillon, où la lumière parcourt l'échantillon deux fois.

En remplaçant (2.15) dans (2.22), on trouve que la résolution axiale d'un OCT est définie par :

$$\Delta z_{FWHM} = \frac{1}{n} \frac{2\ln(2)}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{\Delta \lambda_{FWHM}} \quad (2.23)$$

où le facteur 1/n apparaît lorsque l'échantillon a un indice de réfraction de  $n$ .

En pratique, la résolution axiale est dégradée par la dispersion de la lumière dans l'échantillon ou dans les composantes optiques du microscope (eg. lentilles, objectif). La dispersion est causée par la vitesse de groupe dans un milieu variant en fonction de la longueur d'onde. En effet, la vitesse de propagation de la lumière dépend de l'indice de réfraction d'un milieu, qui lui, varie en fonction de la longueur d'onde. Ceci est particulièrement problématique pour les sources lumineuses avec une grande bande passante, comme en OCT. En ajoutant du verre dans le bras de référence pour créer une dispersion équivalente dans les deux bras, on arrive à réduire l'impact de la dispersion.

### 2.2.1.3 Résolution latérale

La résolution axiale d'un système OCT est entièrement dépendante de la source laser. La résolution latérale dans un microscope OCT sera quant à elle déterminée par les mêmes lois que pour la microscopie confocale, où la lumière est focalisée avec un objectif de microscope. La distribution d'intensité autour du point focal pour un faisceau gaussien est donnée par:

$$I(r, z) = I_0 \left( \frac{\omega_0}{\omega(z)} \right)^2 e^{-2r^2/\omega^2(z)} \quad (2.24)$$

où  $\omega(z)$  est le rayon du faisceau en fonction de la distance axiale ( $z$ ) du point focal,  $\omega_0$  le rayon du faisceau au point focal et  $r$  est la distance radiale par rapport à l'axe optique (Figure 2.5).

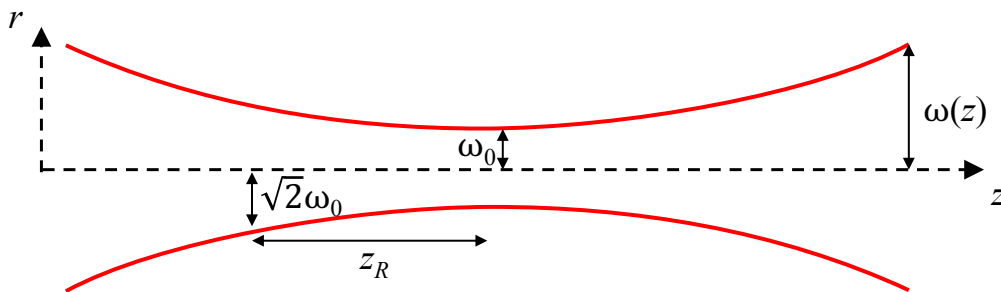


Figure 1.7 : Faisceau gaussien au point focal. La largeur du faisceau  $\omega(z)$  varie en fonction de la distance  $z$  du point focal. Au point focal,  $\omega_0$  représente la distance radiale  $r$  où l'intensité du faisceau chute à  $1/e^2$ . La longueur de Rayleigh  $z_R$  est définie comme la distance du point focal où l'aire du faisceau double, équivalent à un faisceau de rayon  $\sqrt{2}\omega_0$ .

Au point focal on a

$$\omega(z) = \omega_0 \quad \Rightarrow \quad I(r) = I_0 e^{-2r^2/\omega_0^2} \quad (2.25)$$

Le rayon à partir duquel l'intensité est réduite de moitié par rapport à la valeur sur l'axe équivaut à:

$$I(r_{1/2}) = \frac{I_0}{2} \Rightarrow r_{1/2} = \omega_0 \sqrt{\ln(2)/2} \quad (2.26)$$

Ce qui permet de définir la résolution latérale comme étant la largeur à mi-hauteur du point focal :

$$\Delta x_{FWHM} = 2r_{1/2} = \omega_0 \sqrt{2\ln(2)} \quad (2.27)$$

Pour un faisceau gaussien, le rayon du faisceau au point focal  $\omega_0$  est relié au rayon du faisceau à l'entrée de l'objectif de microscope  $\omega_1$  par l'équation suivante :

$$\omega_0 = \frac{f \lambda_0}{\pi \omega_1} \quad (2.28)$$

où  $f$  est la distance focale de l'objectif et  $\lambda_0$  la longueur d'onde centrale du faisceau. Généralement, les objectifs de microscope sont définis par leur ouverture numérique (NA) et non en fonction de leur distance focale :

$$NA = n \frac{D}{2f} = \frac{\omega_1}{f} \quad (2.29)$$

où  $D$  est le diamètre du faisceau entrant dans l'objectif, donc équivalent à  $2\omega_1$  et  $n$  est l'indice de réfraction du milieu à la sortie de l'objectif. Les objectifs de microscope pour les systèmes OCT sont souvent à air, on considère donc  $n=1$ .

En combinant (2.28) et (2.29), on obtient :

$$\omega_0 = \frac{\lambda_0}{\pi NA} \quad (2.30)$$

Ce qui mène à une résolution latérale :

$$\Delta x_{FWHM} = \frac{\lambda_0 \sqrt{2\ln(2)}}{\pi NA} \approx 0.375 \frac{\lambda_0}{NA} \quad (2.31)$$

En OCT, on image à plusieurs points en profondeur et il est donc important de considérer le changement de la résolution latérale par rapport au point focal. Cette résolution axiale augmente en s'éloignant du point focal selon :

$$\Delta x_{FWHM}(z) = \Delta x_{FWHM} \sqrt{1 + \left(\frac{z}{z_r}\right)^2} \quad (2.32)$$

où  $z_r$  est la longueur de Rayleigh, définie comme étant la distance  $z$  où l'aire du faisceau double. Cette distance est donnée par :

$$z_r = \frac{\pi \omega_0^2}{\lambda_0} = \frac{\pi}{2 \ln(2)} \frac{\Delta x_{FWHM}^2}{\lambda_0} \quad (2.33)$$

Cet élargissement du faisceau est important à considérer lors de la conception d'un microscope OCT. Choisir un objectif avec un grand NA offrira une bonne résolution au point focal, mais qui se dégradera rapidement en s'en éloignant. Pour les microscopes OCT qui imagent plusieurs plans axiaux simultanément, les objectifs avec un faible NA sont privilégiés puisque la résolution est maintenue sur une plus grande distance. Les objectifs à petit NA sont généralement des objectifs à air, d'où le choix de  $n = 1$  dans l'équation (2.29).

## 2.2.2 Origine du signal dans les tissus biologiques

Dans la section précédente, il a été établi que le signal en OCT provenait d'une réflexion de la lumière à l'intérieur même de l'échantillon. Dans les tissus biologiques, ces réflexions se produisent aux interfaces présentant un changement d'indice de réfraction. À noter aussi que dans les tissus biologiques, ces interfaces ne sont pas lisses à l'échelle de la longueur d'onde du faisceau lumineux. On ne peut donc pas parler de réflexion, mais plutôt de rétrodiffusion de la lumière. L'OCT génère donc un contraste endogène dans les tissus, où aucun marquage n'est nécessaire.

Le contraste émanant de l'OCT dans le tissu cervical a été exhaustivement étudié. D'abord, la gaine de myéline entourant les axones de certains neurones possède un indice de réfraction élevé ( $n \sim 1,44$ ) (Ben Arous 2011) par rapport à l'indice de réfraction en arrière-plan ( $n \sim 1,37$ )

principalement dominé par les neurites (*i.e.* dendrites et axones) (Sun et al. 2012). Ce grand changement d'indice de réfraction produit un fort contraste des axones myélinisés, et donc de la matière blanche (Jeon et al. 2006). Ce contraste est toutefois dépendant de l'orientation des fibres de matière blanche (Leahy, Radhakrishnan, and Srinivasan 2013; H. Wang, Zhu, and Akkin 2014) puisque la diffusion de la lumière sur les axones myélinisés cylindriques est anisotrope (Figure 2.6.D). En effet, les fibres orientées dans un plan perpendiculaire à l'axe optique verront un maximum de lumière rétrodiffusée sur l'axe optique alors que celles orientées à un angle oblique verront une quantité de lumière rétrodiffusée dans l'axe optique diminuée (Figure 2.6.A). Les fibres myélinisées orientées selon l'axe optique auront même un signal plus faible que le tissu environnant (Figure 2.6.B), suggérant un milieu homogène à l'intérieur des axones. Le changement d'intensité dans les fibres myélinisées n'est à lui seul pas suffisant pour déterminer l'orientation par rapport à l'axe optique. En effet, d'autres facteurs régissent l'intensité du signal tel que l'atténuation. En OCT standard, il n'est donc possible que de déterminer l'orientation en 2D des fibres (Figure 2.6.E). Sous un fort grossissement (40X), il est possible d'imager en OCT les corps cellulaires des neurones. Les neurones présentent un faible signal par rapport au tissu environnants (Figure 2.6.C), suggérant un indice de réfraction intracellulaire uniforme et un corps cellulaire sphérique (Leahy, Radhakrishnan, and Srinivasan 2013). D'autre part, en imageant le tissu cervical à plus faible grossissement, la limite de résolution empêchera de voir les petites structures telles que les corps cellulaires et seules les grosses structures, comme les fibres de matières blanches, qui peuvent mesurer plus de 10 $\mu$ m de diamètre, présenteront un contraste différent du tissu environnant (*i.e.* neurites, corps cellulaires, etc.) (Figure 2.6.A).



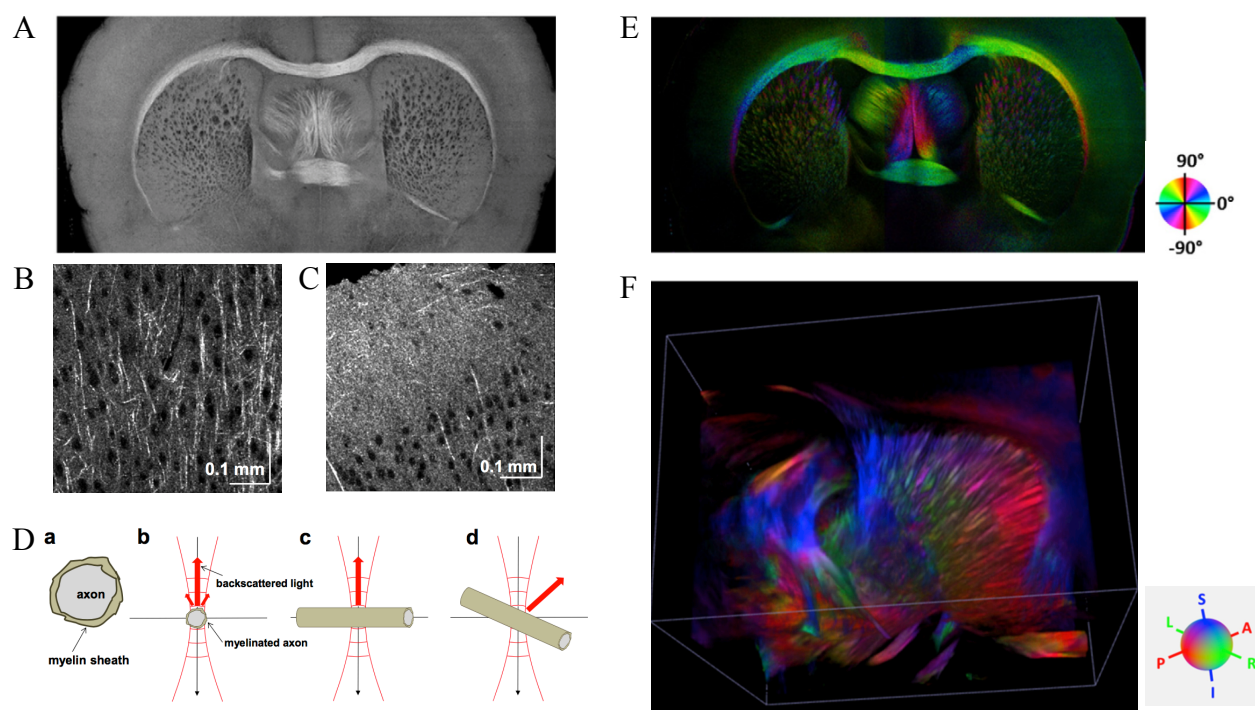


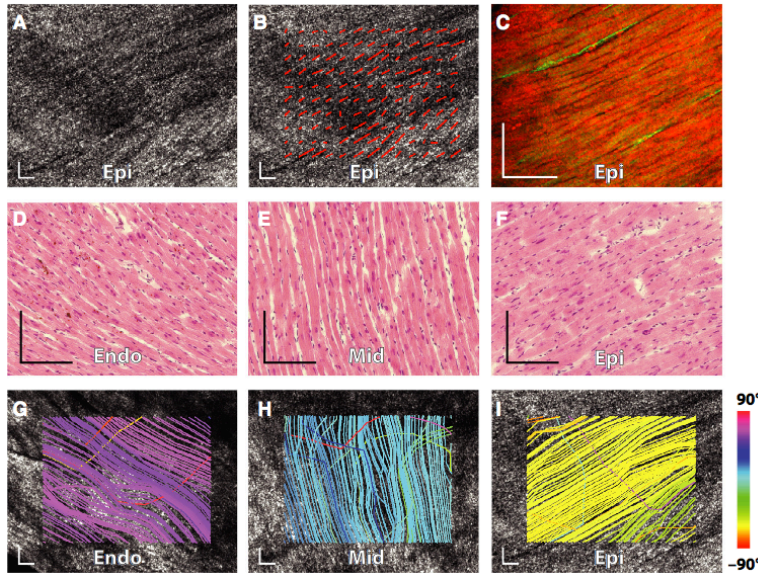
Figure 1.8 : Contraste OCT dans le tissu cervical de souris. A : à faible résolution, le contraste provient de la matière blanche. B : la matière blanche dans le cortex présente un contraste dépendant de l'orientation des fibres. En blanc, les fibres se propageant dans le plan d'imagerie et en noir les fibres dans l'axe optique. C : les corps cellulaires des neurones ressortent avec une faible intensité sous haut grossissement. D : impact de l'orientation des fibres myélinisées sur le signal rétrodiffusé. E : orientation 2D des fibres de matières blanches présentées en A. F : tractographie en 3D lorsque l'orientation dans l'axe optique est déterminée par l'utilisation d'un OCT polarisé. A-E : tirée de (H. Wang, Zhu, and Akkin 2014). B-C-D : tirée de (Leahy, Radhakrishnan, and Srinivasan 2013). F : tirée de (H. Wang, Lenglet, and Akkin 2015).

Des microscopes à tomographie sérielle en OCT ont été développés pour imager la matière blanche dans le cerveau de murins en entier (H. Wang, Zhu, and Akkin 2014; H. Wang et al. 2014). Cartographier la matière blanche dans le système nerveux central est important non seulement pour la recherche en neuroscience, mais aussi pour le diagnostic clinique. Un consensus émerge selon lequel des maladies du cerveau sont associées avec des anomalies de la matière blanche (Fields 2008; Sundgren et al. 2004). L'OCT sensible à la polarisation (H. Wang, Al-Qaisi, and Akkin 2010) a aussi fait son apparition, permettant de déterminer avec précision le retard de phase induit dans les tissus biréfringents tels que les fibres myélinisées et ainsi trouver leur orientation par rapport à l'axe optique de la lumière. En intégrant l'OCT polarisé dans un

système microscope tomographique sériel, il est possible de trouver l'orientation en trois dimensions dans le cerveau en entier et faire de la tractographie (Figure 2.6.F) (H. Wang et al. 2011; H. Wang, Lenglet, and Akkin 2015) à une résolution bien supérieure à ce qui se fait en imagerie du tenseur de diffusion (Wu et al. 2013; Jiang and Johnson 2010). La tractographie dans le cerveau peut aider à comprendre les mécanismes liés aux accidents vasculaires cérébraux et aux tumeurs ainsi que d'améliorer notre compréhension du développement de ce dernier (Sundgren et al. 2004; Chanraud et al. 2010).

L'OCT a aussi été utilisé pour imager le cœur, où le tissu myocardique présente un bon contraste (Goergen et al. 2012). Le tissu myocardique présente une structure particulière (D. D. Streeter et al. 1969) où les fibres sont caractérisées par un angle variant selon la profondeur de la surface (angle transverse) (Figure 2.7.A) et selon l'axe base-apex (angle hélix) (Figure 2.7.B). Cette organisation particulière régit la fonction mécanique et électrique du cœur (LeGrice, Takayama, and Covell 1995; Taccardi et al. 1994). La microscopie OCT a permis de mettre en valeur cette organisation tridimensionnelle (Yuanbo Wang and Yao 2013; Y. Wang et al. 2014; Fan and Yao 2013). Les cardiomyopathies sont connues pour engendrer une désorganisation des fibres myocardiques (W. Li et al. 2009). De plus, il a été répertorié qu'un changement de l'organisation dans le myocarde se produit suite à un infarctus (Goergen et al. 2016). La haute résolution de l'orientation des fibres myocardiques en OCT résultera en une meilleure compréhension des phénomènes régissant l'organisation du myocarde.

A



B

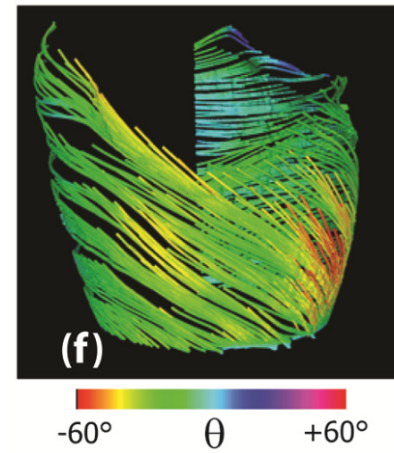


Figure 1.9 : Contraste OCT dans le tissu cardiaque de la souris. A : l'orientation transverse des fibres mesurées en OCT et validée par l'histologie (rangée du centre) varie en fonction de la profondeur par rapport à la surface. Endo : *endocardium*. Mid : *midwall*, Epi : *epicardium*. Tirée de (Goergen et al. 2016). B : tractographie en 3D du cœur de souris mettant en évidence l'angle hélix des fibres myocardique. Tirée de (Yuanbo Wang and Yao 2013).

## CHAPITRE 3 MÉTHODOLOGIE

La conception de la plateforme d'histologie massive se subdivise en deux grandes classes. La première étant l'imagerie qui est assurée par la conception d'un microscope à tomographie par cohérence optique (OCT) et la seconde étant le sectionnement du tissu par vibratome. Enfin, l'intégration de l'OCT avec le sectionnement du tissu permettant l'acquisition automatique d'organes entiers sera mise de l'avant.

### 3.1 Microscope à tomographie par cohérence optique

L'OCT a été sélectionné pour cette plateforme d'histologie massive puisque c'est une technique permettant d'obtenir de l'information en profondeur, augmentant ainsi l'échantillonnage axiale. De plus, l'utilisation d'un OCT dans le domaine fréquentiel permet d'acquérir des données volumétriques à une vitesse bien supérieure par rapport à l'OCT dans le domaine temporel. Dans ce cas précis, une source à balayage spectral (Axsun) ayant une longueur d'onde centrale à  $\lambda_0 = 1310$  nm avec une largeur de bande de  $\Delta\lambda = 100$  nm (Figure 3.1) a été utilisée. La lumière sortant de la source est guidée dans une fibre optique. Suivant le principe de l'OCT, un coupleur à fibre optique (CF) divise la lumière dans le bras échantillon qui reçoit 90% de la puissance lumineuse et le bras de référence qui reçoit le 10% de l'intensité de la source. La lumière circulant dans les deux bras passe ensuite dans leurs circulateurs optiques (CIR) respectifs avant d'être envoyée dans un collimateur où le faisceau devient collimé à l'air libre. La lumière fait ensuite l'aller-retour dans les bras échantillon et référence avant d'être rétrodiffusée dans l'échantillon ou réfléchi sur le miroir (M) et revenir dans le collimateur.

Les sections 3.1.1 et 3.1.2 décriront en détail les deux bras ainsi que le choix des composantes optiques. La lumière provenant des deux bras repasse ensuite dans le circulateur optique avant d'être recombinaisonnée dans un coupleur à fibre optique 50/50, puis d'être séparée à nouveau en deux parties égales pour permettre la détection du patron d'interférence à l'aide d'un photo-détecteur équilibré (PDE). La séparation du faisceau en deux parts égales permet au photo-détecteur

équilibré de soustraire la composante continue du laser et d'ainsi améliorer le rapport signal sur bruit.

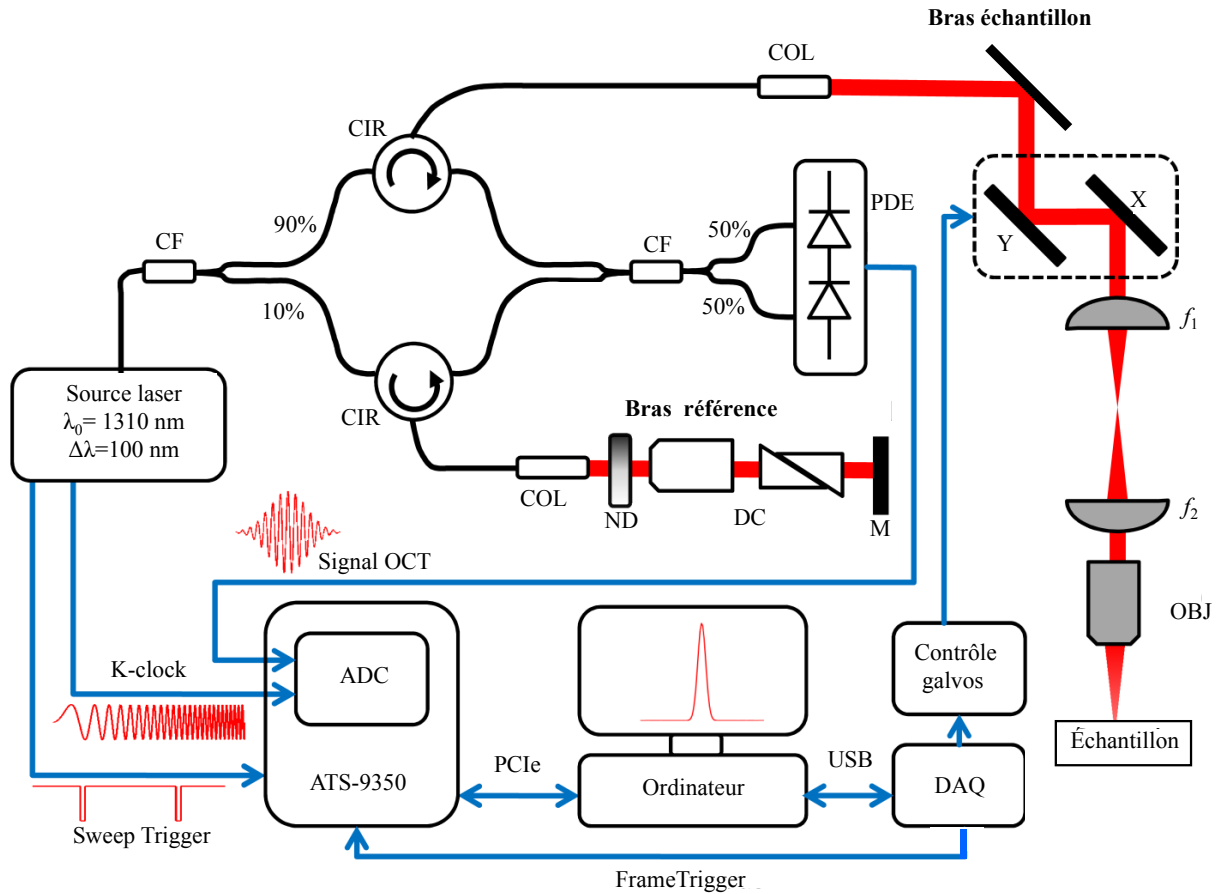


Figure 3.1 : Montage OCT. Principales composantes du microscope OCT. Les lignes bleues représentent des signaux électriques, les lignes noires représentent la fibre optique et les lignes rouges représentent le faisceau laser à l'air libre. Les boîtes représentent des composantes matérielles. Abréviations : CF : coupleur à fibre optique, CIR : circulateur optique, COL : Collimateur, ND : filtre à densité neutre, DC : verre à compensation de dispersion, M : miroir, PDE : photodétecteur équilibré, X-Y miroirs galvanométriques,  $f_1$  et  $f_2$  : lentilles du télescope, DAQ : Carte d'acquisition, USB : *Universal Serial Bus*, PCIe : *Peripheral Component Interconnect Express*, ADC : conversion analogue-digital, ATS-9350 : numériseur.

### 3.1.1 Bras échantillon

Le bras échantillon est le faisceau lumineux qui interagit avec l'échantillon. À la sortie du collimateur, le faisceau devient collimé à l'air libre. Il est ensuite envoyé sur une paire de miroirs galvanométriques qui permettent de dévier le faisceau en deux dimensions (X-Y) pour qu'il entre à angle dans l'objectif, ce qui permettra un balayage du laser sur la surface de l'échantillon (Figure 3.2). Le faisceau traversera ensuite les lentilles convergentes  $f_1$  et  $f_2$  qui agissent comme un télescope.

Ces lentilles possédant une couche antireflet dans l'infrarouge (1050 nm – 1700 nm) jouent deux rôles majeurs. D'abord, le rapport de leurs focales  $f_2 / f_1$  détermine le grossissement que subit le faisceau sortant de la fibre optique. Pour ce système, les lentilles utilisées ont une distance focale de  $f_1 = 35$  mm et  $f_2 = 100$  mm donnant un facteur de grossissement du faisceau de 2,85x, ce qui permet de remplir la pupille de l'objectif. De plus, le télescope permet à la lumière d'entrer à angle dans l'objectif, tout en restant centrée sur l'axe optique. Un objectif télécentrique (OBJ) (Thorlabs, LSM04) est utilisé sur ce montage. Un objectif télécentrique a un champ de vue non-angulaire, ce qui permet d'éliminer l'erreur paraxiale des objectifs standards. Les faisceaux sortant d'un objectif télécentrique sont donc tous parallèles, permettant de conserver un plan image plat. Un faible grossissement de 3x permet d'imager de grandes régions d'intérêt en plus de donner une bonne profondeur de champ, nécessaire pour conserver une bonne résolution en profondeur. Le fabricant de l'objectif spécifie la distance (SD) à laquelle la pupille de l'objectif doit être placée du point focal de la lentille  $f_2$  ainsi que la distance de travail (WD) qui représente la distance entre le plan focal de l'objectif et l'ouverture de l'objectif. Cet objectif fonctionne à l'air, c'est-à-dire que l'ouverture de l'objectif doit se trouver dans l'air. Dans notre cas particulier, l'échantillon biologique doit se trouver submergé dans l'eau en tout temps. Il y aura donc inévitablement un passage de l'air à l'eau entre l'objectif et l'échantillon. Pour éviter les artéfacts causés par un changement de la hauteur de la colonne d'eau par-dessus l'échantillon et les ondulations à la surface de l'eau, une capsule à immersion dans l'eau (CIM) est installée au-dessus de l'échantillon.

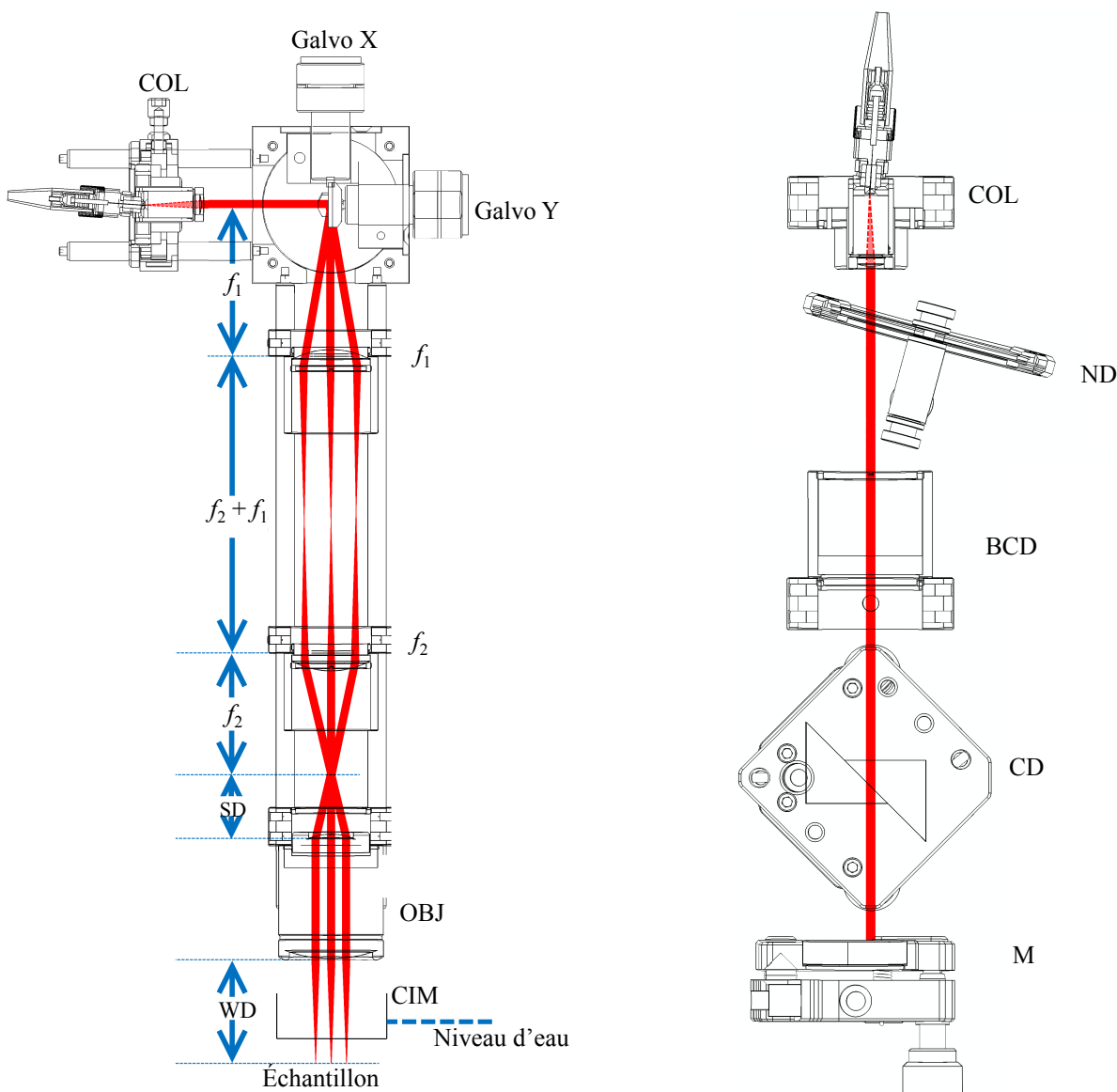


Figure 3.2 : Bras échantillon et bras de référence de l'OCT. Gauche : Bras échantillon. La lumière passe à l'air libre en sortant du collimateur (COL). Les miroirs galvanométriques (Galvo X et Galvo Y) dévient le faisceau par rapport à l'axe optique. Les lentilles  $f_1$  et  $f_2$  changent la taille du faisceau et permettent d'atteindre la distance de scan (SD) de l'objectif (OBJ) centré sur l'axe optique. Le focus sur l'échantillon se fait à une distance de travail WD de 42,3 mm. La capsule d'immersion (CIM) permet le passage du faisceau de l'air à l'eau. Droite : bras de référence. La lumière sort du collimateur et traverse un filtre à densité neutre (ND), un bloc de verre qui compense la dispersion de l'objectif (BDC) et deux prismes qui compensent la dispersion causée par les lentilles du télescope avant de frapper un miroir et revenir dans le collimateur.

### 3.1.2 Bras de référence

Le bras de référence permet de créer une interférence constructive avec la lumière rétrodiffusée dans le bras échantillon. D'abord, la lumière sortant du collimateur (COL) traversera un filtre à densité neutre (ND) (Figure 3.2). Cet atténuateur permet de maximiser le signal d'interférence mesuré tout en évitant de saturer le photo-détecteur. Pour compenser la dispersion de la lumière causée par les pièces optiques dans le bras échantillon, une épaisseur équivalente de verre doit être introduite dans le bras de référence. Ainsi, un bloc de verre (BCD) spécialement conçu pour compenser la dispersion de la lumière introduite par l'objectif est placé dans le parcours optique du bras de référence. Pour compenser la dispersion causée par les deux lentilles du télescope, deux prismes de verre (N-BK7) sont aussi introduits dans le bras de référence. En glissant les deux prismes l'un sur l'autre, on peut modifier l'épaisseur de verre introduit dans le parcours optique. Les surfaces extérieures des prismes possèdent une couche antireflet dans l'infrarouge (1050 nm - 1700 nm). Une fine couche d'huile entre les deux prismes permet de limiter les sauts d'indice de réfraction. Finalement, le faisceau frappe un miroir avant d'être renvoyé dans la fibre optique pour interférer avec la lumière du bras échantillon. La position et l'orientation du miroir sont primordiales. Le miroir est placé sur une platine de positionnement linéaire avec déplacement micrométrique pour s'assurer que le bras de référence ait exactement la même longueur que le bras échantillon. De plus, le miroir est placé dans une monture à angle ajustable pour que le faisceau revienne dans la fibre optique.

### 3.1.3 Acquisition des volumes OCT

Les sections précédentes décrivent le détail de l'optique derrière la conception de l'OCT. Pour enregistrer des volumes OCT un travail de synchronisation entre les différentes composantes du microscope est nécessaire. Le signal RF sortant du photo-détecteur équilibré est perçu par un convertisseur analogue numérique. La source laser balaie l'entièreté de son spectre à une fréquence de 50 kHz où 1152 points doivent être enregistrés pour constituer une ligne-A, ce qui revient à enregistrer 57,6 millions de points par seconde. Un convertisseur analogue numérique (ATS-9350, AlazarTech), permettant l'acquisition jusqu'à 500 millions d'échantillons par seconde avec une résolution sur 12 bits, a été choisi pour répondre aux besoins du système. La



synchronisation de l'acquisition du signal RF avec chaque ligne-A se fait à l'aide de la *k-clock* et du *sweep trigger* provenant de la source laser qui sont envoyés vers le numériseur ATS-9350 (Figure 3.1). Le *sweep trigger* envoie un signal à la carte indiquant lorsque le laser recommence à faire son balayage en fréquence, soit le début d'une nouvelle ligne-A. La *k-clock* dont la fréquence varie de façon non linéaire entre 57,1 et 147,2 MHz permet à la carte de distinguer 1152 différentes longueurs d'onde représentant les différents points à l'intérieur d'une même ligne-A. Pour enregistrer un volume OCT, il faut donc spécifier au numériseur le nombre de points à acquérir par ligne-A, le nombre de ligne-A par ligne-B ainsi que le nombre de ligne-B par volume OCT. Le déclenchement d'une acquisition volumétrique se contrôle à partir de l'ordinateur. Celui-ci envoie à la carte d'acquisition (DAQ) le signal de déclenchement de l'acquisition (*Frame Trigger*). Ce dernier étant synchronisé au signal envoyé vers les miroirs galvanométriques qui permettent le balayage spatial de l'échantillon.

Les signaux envoyés aux miroirs galvanométriques permettent de contrôler leur orientation angulaire pour ainsi déplacer le point focal sur un plan dans l'échantillon. Ces signaux, aussi appelés rampes, déterminent l'inclinaison des miroirs, où 0,5 V équivaut à une inclinaison de 1°. Pour déterminer la tension applicable aux miroirs galvanométriques, il faut prendre en considération les distances focales des deux lentilles du télescope, la distance focale de l'objectif ainsi que le champ de vue (FOV) désiré. La Figure 3.3 met en relation ces différents paramètres à considérer.

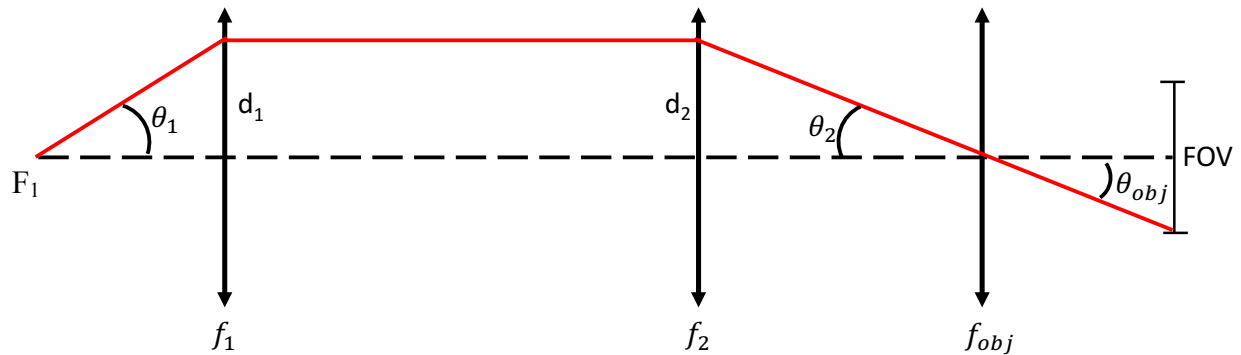


Figure 3.3 : Angle de déflexion des miroirs galvanométriques. Parcours optique de la lumière dans le bras échantillon suivant une déviation des miroirs galvanométriques.  $f_1$  et  $f_2$  : lentilles du télescope.  $d_1$  et  $d_2$  distance du faisceau lumineux avec l'axe optique des lentilles.  $\theta_1$  : angle de déviation d'un miroir galvanométrique.  $\theta_2$  : angle d'entrée de la lumière dans l'objectif de focal  $f_{obj}$ .  $\theta_{obj}$  : angle de sortie de la lumière de l'objectif. FOV : champ de vue.

Si l'on suppose que la déviation du faisceau par les deux miroirs galvanométriques se fait au point focal  $F_1$ , alors le faisceau, une fois qu'il aura traversé la lentille  $f_1$  sera parallèle à l'axe optique. La distance qui sépare le faisceau du centre de la lentille sera donc équivalente pour les deux lentilles :

$$d_1 = d_2 \quad (3.1)$$

Par trigonométrie on peut affirmer :

$$f_1 \tan \theta_1 = f_2 \tan \theta_2 \quad (3.2)$$

La lumière entrant à angle dans la lentille de l'objectif est centrée sur l'axe optique. Dans ce cas particulier, l'angle de sortie de la lumière sera le même que l'angle d'entrée :

$$\tan \theta_2 = \tan \theta_{obj} = \frac{FOV/2}{f_{obj}} \quad (3.3)$$

Lorsqu'on travaille avec des objectifs de microscope, il faut considérer la distance focale effective spécifiée par le fabricant. Pour cet objectif télécentrique 3x, nous avons  $f_{obj} = 54$  mm. En plaçant l'équation (3.3) dans l'équation (3.2) et en isolant  $\theta_1$ , on obtient :

$$\theta_1 = \tan^{-1} \left( \frac{f_2 FOV}{2 f_1 f_{obj}} \right) \quad (3.4)$$

Considérant que l'on image un champ de vue de 2,5 x 2,5 mm et avec un télescope comportant des focales  $f_1 = 35$  mm et  $f_2 = 100$  mm, il faudrait donc faire dévier les miroirs galvanométriques X et Y de -3,78 ° à 3,78°.

L'échantillon est balayé ligne par ligne. On définit donc un axe rapide (X) et un axe lent (Y). Pour une même position de l'axe lent, il y a un balayage de  $-\theta$  à  $\theta$  de l'axe rapide (Figure 3.4). La rampe de l'axe rapide est une pente subdivisée en 512 points équidistants entre  $-\theta$  et  $\theta$  pour avoir un déplacement linéaire du point focal sur l'échantillon. Durant cette montée, 512 lignes-A sont acquises pour chaque position du miroir galvanométrique X. Pour être synchrone avec le *sweep trigger* de la source laser, le temps de résidence à chaque position de la rampe X doit être de  $1/(50 \text{ kHz})$ . Suite à la montée du miroir galvanométrique X, il y a une période de redescente vers  $-\theta$  qui dure  $57 \times 1/(50 \text{ kHz}) = 1,14$  ms où l'enregistrement des données n'a pas lieu. Par la suite, le miroir galvanométrique définissant l'axe lent (Y) fait un déplacement de  $2\theta/512$  pour capturer la ligne-B suivante. Ce faisant, on obtient un volume OCT contenant 512x512 lignes-A contenant 1152 points chacune.

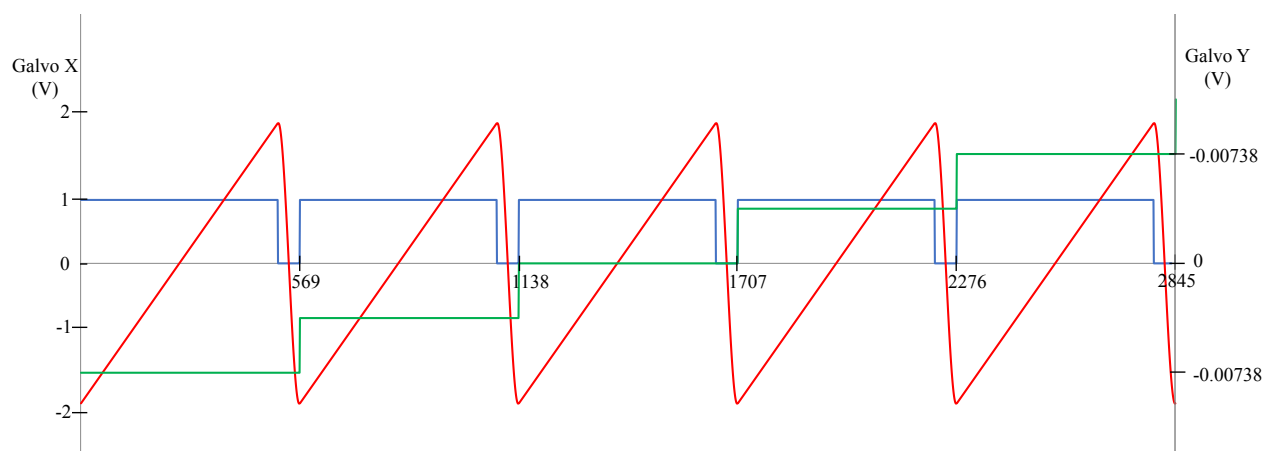


Figure 3.4 : Signaux générés pour les miroirs galvanométriques. Voltage envoyé aux miroirs galvanométriques pour changer leur orientation. L'illustration montre les tensions appliquées aux miroirs galvanométriques pour l'acquisition de 5 lignes-B centrées sur l'origine en Y. En dents de scie (rouge), la rampe pour l'axe rapide (X) avec l'échelle de la tension électrique sur l'axe vertical à gauche. La rampe en escalier (vert) montre la tension appliquée pour balayer dans l'axe lent avec l'échelle à droite. La signal carré (bleu) montre les points où les données sont enregistrées.

Les données brutes acquises par le numériseur sont transférées à l'ordinateur par bus PCIe. Avant d'être enregistrées aux disques, les données volumétriques sont prétraitées afin d'en réduire la taille. En effet, les données brutes constituent un volume de  $512 \times 512 \times 1152 \approx 0.3 \times 10^9$  points. Si on enregistre ces volumes bruts sur 2 octets pour conserver toute la plage dynamique qu'offre le numériseur (résolution sur 12 bits), chaque volume occuperait 576 Mo sur le disque. Dans un cas normal, une acquisition d'un cerveau de souris nécessite près de 2000 volumes OCT pour imager l'entière de l'organe. L'espace disque occupé par un seul cerveau sera donc d'approximativement 1.1 To. Par contre, les lignes-A brutes contiennent de l'information jusqu'à 5 mm en profondeur dans l'air, ou 3,76 mm dans un milieu ayant un indice de réfraction de 1,33 tel que l'eau ou les tissus biologiques. Considérant la faible profondeur de champ d'un objectif à microscope ainsi que la diffusion et l'atténuation de la lumière dans les tissus biologiques, l'information provenant de quelques centaines de microns sous la surface du tissu sera dominée par le bruit.

L'exemple à la Figure 3.5 présente un exemple d'une ligne-A lorsqu'on image un miroir. Le signal provenant d'un miroir dans le domaine temporel prend la forme d'un sinus, où la période dépend de la profondeur du miroir par rapport à la position zéro dans l'interférogramme. Pour ne

conserver que l'information axiale pertinente, il faut retrouver l'information dans le domaine fréquentiel en procédant par une transformée de Fourier. Avant de faire ceci, il faut d'abord soustraire le signal provenant du bras de référence seulement. Ce faisant, on élimine la composante DC provenant de la source laser (Figure 3.5.B). Ensuite, on multiplie le résultat par une fenêtre de Blackman pour éviter l'apparition d'un sinus cardinal dans la transformée de Fourier. Ici, on ne prend que la partie centrale de la fenêtre (Figure 3.5.C) pour ne pas trop réduire le FWHM de notre spectre tout en réduisant les effets de bords de la transformée de Fourier. En appliquant une transformée de Fourier à la ligne-A dans le domaine temporel (Figure 3.5.D) on obtient une ligne-A dans le domaine fréquentiel (Figure 3.5.E), où chaque point représente une profondeur dans l'interférogramme. Pour les fins de ce système, les données sur une profondeur de 780 $\mu\text{m}$  autour du point focal sont enregistrées au disque dur. Au total, approximativement 8 secondes sont requises pour enregistrer un volume traité au disque. Soit un peu plus de 5 secondes pour acquérir 512x512 lignes-A à un taux de 50kHz, et environ 3 secondes pour le traitement par FFT et l'enregistrement au disque.

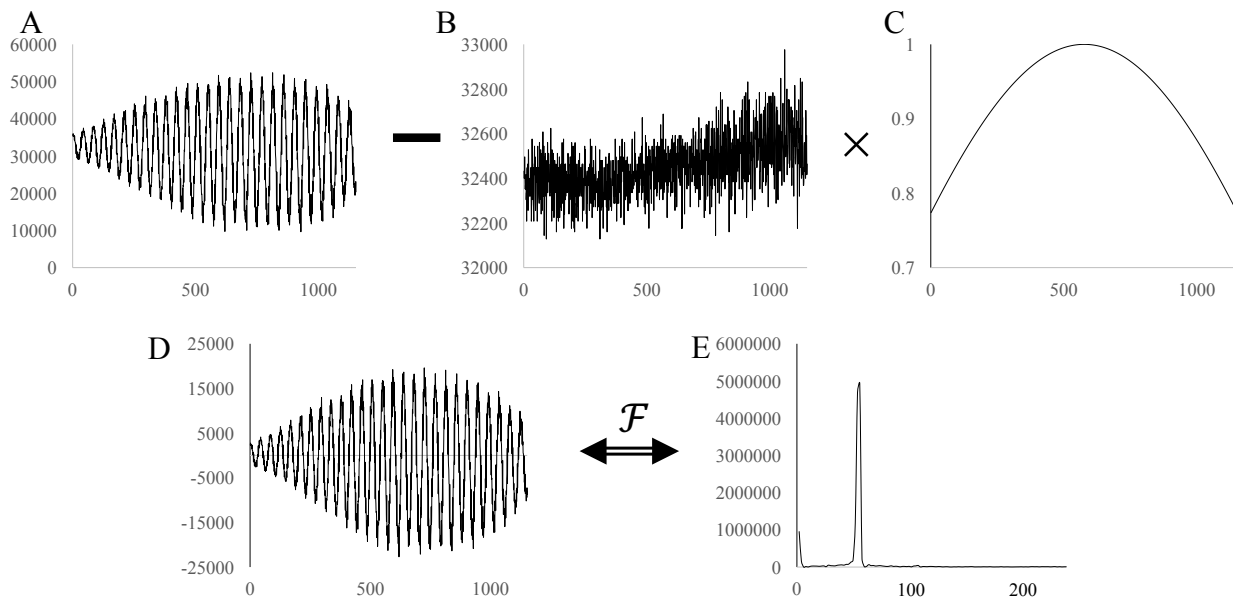


Figure 3.5 : Prétraitement de la ligne-A. A : Interférogramme brut provenant de l'OCT. B : signal provenant du bras de référence. C : fenêtrage de Blackman. D : résultat obtenu en soustrayant B à A, puis en multipliant par C. E : Transformée de Fourier du signal en D. Axe vertical encodé sur 16 bits sauf en C. L'axe horizontal de A - D représente le nombre d'onde alors qu'en E elle représente une profondeur spatiale. L'axe vertical est l'intensité du signal.

### 3.1.4 Caractérisation de l'OCT

La résolution axiale d'un microscope OCT peut être mesurée en imageant la surface d'un miroir, tel que présenté à la Figure 3.5. Dans un OCT idéal, avec une très grande largeur de bande spectrale, le miroir dans le domaine temporel aurait l'aspect d'une fonction sinusoïdale parfaite. En passant dans l'espace de Fourier, on retrouverait donc une fonction Dirac, qui représente la surface du miroir. En mesurant la largeur à mi-hauteur (FWHM) du pic d'un miroir dans l'espace de Fourier on peut avoir une mesure de la résolution axiale du système. L'OCT développé montre une largeur à mi-hauteur de 3 points sur la ligne-A. Sachant que notre interférogramme image sur une distance de 3,76 mm avec 1152, on obtient une résolution axiale :

$$\Delta z_{FWHM} \approx 10 \mu m$$

Selon l'équation (2.23) la résolution théorique qu'on pourrait obtenir avec notre source laser est de :

$$\Delta z_{FWHM} = \frac{1}{n} \frac{2 \ln(2)}{\pi} \frac{\lambda_0^2}{\Delta \lambda} = 5,7 \mu m$$

Cette différence peut provenir du fait que notre source n'est pas gaussienne. Une source non gaussienne verra sa résolution axiale réduite. Selon le manufacturier, le spectre de la source est une fonction carrée qu'on multiplie par un filtre de Blackman partiel, pour réduire partiellement les effets de bords. Il aurait été possible de multiplier le spectre par une gaussienne où les longueurs d'onde aux extrémités du spectre tomberaient à zéro, mais ce faisant, on réduirait considérablement le FWHM spectral. Il faut faire un compromis entre l'adoucissement des effets de bord et le FWHM du spectre. La différence entre la résolution théorique et mesurée peut aussi s'expliquer par la dispersion dans l'échantillon. En effet, dans le bras de référence, du verre a été mis pour compenser la dispersion dans le télescope et l'objectif, mais la colonne d'eau au-dessus du miroir n'est pas considérée, ce qui engendre une perte de résolution axiale. Il existe des techniques pour compenser de façon numérique la dispersion dans l'espace  $k$  (Hillmann et al. 2012; Wojtkowski et al. 2004). La Figure 3.6 montre l'effet de la compensation de dispersion en utilisant ces deux techniques. Pour les deux techniques, le gain en résolution est inférieur à 1  $\mu m$ , suggérant que le verre ajouté dans le bras de référence compense bien la dispersion. Ainsi, aucun algorithme pour compenser la dispersion n'a été utilisé dans l'acquisition de nos données.

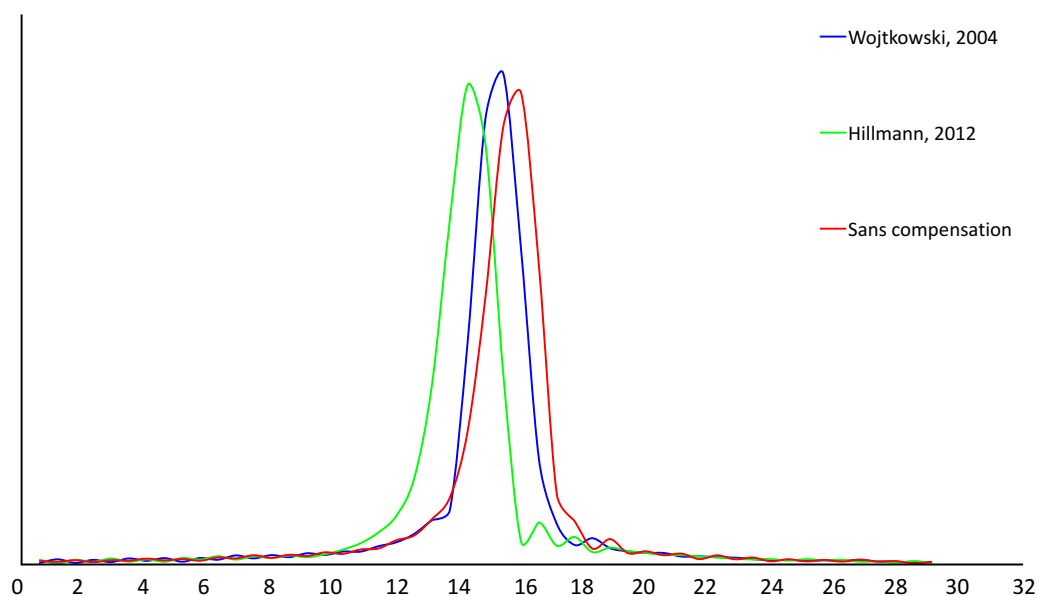


Figure 3.6 : Compensation de la dispersion. Effet de la compensation de la dispersion en utilisant la technique de Wojtkowski (bleu), Hillmann (vert) et sans compensation (rouge). L'échelle horizontale représente des points dans la ligne-A, où chaque point équivaut à  $6,5 \mu\text{m}$ .

La résolution latérale de l'OCT a aussi été mesurée. Celle-ci peut être mesurée à l'aide d'une cible de résolution. Une cible de résolution présente des franges métalliques (franges claires) qui sont réfléchissantes et des franges sans dépôt métallique, où la lumière est transmise (franges sombres). Le passage d'une frange claire à une frange sombre donne la fonction d'étalement d'un bord (ESF). La résolution latérale est alors mesurée comme étant la distance pour passer de 90% à 10% de l'intensité maximale réfléchie lors du passage d'une frange claire à une frange sombre. Comme la résolution latérale est fortement dépendante de la position par rapport au plan focal, elle a été mesurée en fonction de la distance du focus (Figure 3.7).

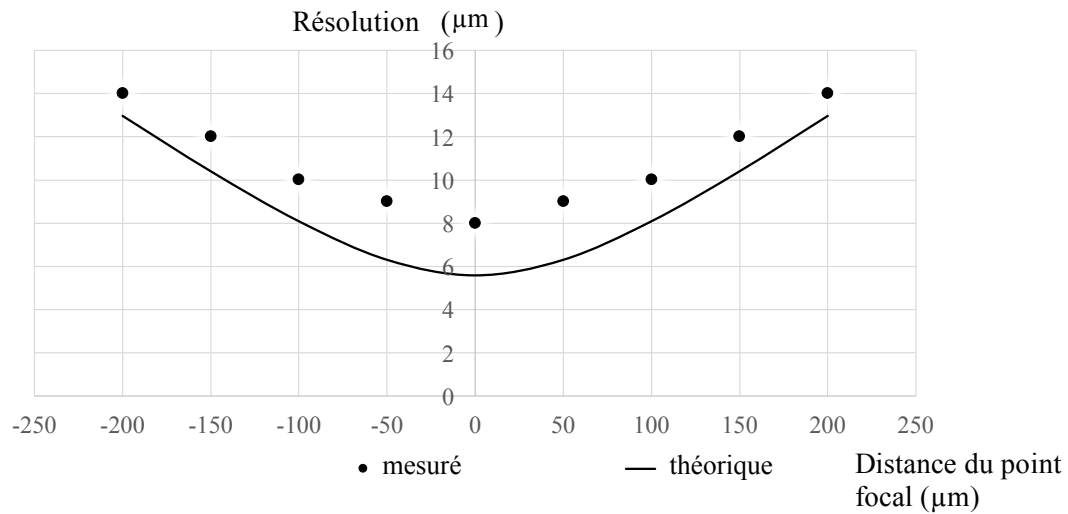


Figure 3.7 : Résolution latérale du microscope. Le trait plein représente la résolution théorique attendue du microscope. Les points représentent la résolution mesurée en fonction de la distance par rapport au focus. L'axe horizontal représente la distance par rapport au plan focal (en  $\mu\text{m}$ ) et l'axe vertical la résolution mesurée en  $\mu\text{m}$ .

La résolution théorique est calculée en fonction des équations développées à la section (2.2.1.3) en considérant que le faisceau a une taille de 2,5 mm à la sortie du collimateur. Plusieurs facteurs peuvent expliquer la différence entre les valeurs obtenues et les valeurs théoriques. D'abord, la difficulté de déterminer avec précision la taille du faisceau, qui change grandement la résolution au point focal et la distance de Rayleigh. Aussi, si les lentilles du télescope ne sont pas exactement à une distance de  $f_1 + f_2$  l'une de l'autre, le faisceau entrant dans l'objectif ne sera pas collimé, ce qui aura aussi un impact sur la résolution du système.

Une autre caractéristique à considérer dans la conception d'un OCT est la sensibilité de détection. Selon la technique de mesure présentée dans (Agrawal et al. 2017), où la sensibilité est déterminée en comparant le signal provenant d'un miroir et le bruit de fond, on mesure un rapport signal sur bruit de  $SNR = 98.5$  dB. La perte de sensibilité avec la profondeur est aussi un aspect à considérer lors de la conception d'un OCT. Par contre, dans notre cas, on ne conserve les données que sur quelques centaines de micromètres autour du point focal et on peut donc négliger cet impact.



## 3.2 Vibratome

L'OCT dans le proche infrarouge permet d'imager les tissus biologiques sur quelques centaines de micromètres. Passée cette profondeur, la diffusion et l'absorption du tissu réduisent le SNR à un point où la formation d'image n'est plus possible. Pour exposer une nouvelle section de tissu à imager, il faut faire appel à une technique de sectionnement du tissu. Pour le présent montage, un microtome à lame vibrante (*i.e.* vibratome) a été conçu pour efficacement couper des sections épaisses de tissus frais (200 $\mu$ m).

### 3.2.1 Design mécanique

La Figure 3.8 présente le design utilisé pour concevoir le vibratome. Ce design fut basé sur celui présenté dans (Ragan et al. 2012). La pièce maitresse du vibratome, en aluminium, est présentée en C. Le mouvement du vibratome est généré par un moteur à courant continu (Faulhaber, Micromotor 3863). Ce moteur rotatif est fixé sur la pièce C au point d'ancrage (i). Sur l'arbre du moteur, on y appose la pièce présentée en A. La cavité dans laquelle on insère l'arbre du moteur et l'arbre de cette pièce sont désaxées de 800 $\mu$ m. Ainsi, lorsque le moteur se met en mouvement, l'arbre de la pièce A suit un mouvement circulaire d'un rayon de 800 $\mu$ m autour du moteur. Ce mouvement en deux dimensions est transmis à la flexure 1 (Figure 3.8.C.ii) à l'aide de la pièce en (B). La flexure 1 est conçue de sorte qu'elle soit rigide dans la direction X et souple dans la direction Y. Ainsi, la force transmise à la flexure 2 (Figure 3.8.C.iii) aura une grande composante dans la direction X et une composante dans la direction Y négligeable. La flexure 2 possède au contraire une grande flexibilité dans la direction X et est très rigide dans la direction Y. Ainsi au point d'attache du support à lame de rasoir (Figure 3.8.C.iii) un mouvement précis sera produit dans la direction X, aussi appelé la direction transverse à la coupe (flèche rouge, Figure 3.8). Pour obtenir des tranches franches du tissu, une lame de rasoir d'une longueur de 40 mm est maintenue à une inclinaison de 11° par rapport à l'horizontale par le support à lame (Figure 3.8.D).

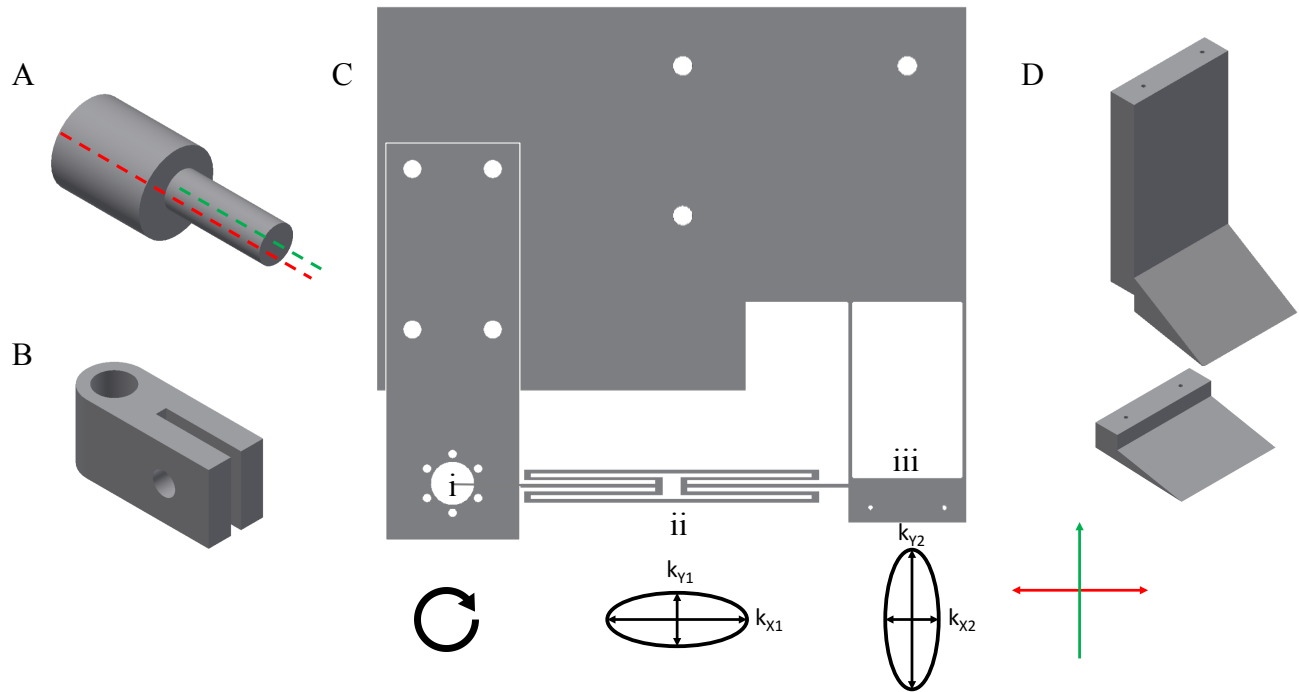


Figure 3.8 : Design du vibratome. A : Arbre décentré. L'axe du moteur rotatif (rouge) est décentré de  $800\mu\text{m}$  par rapport à l'axe de l'arbre (vert). B : Lien entre l'arbre décentré et la flexure 1 du vibratome. C : Vibratome : (i) : point d'attache du moteur rotatif et de l'arbre décentré. (ii) flexure 1 possédant une grande rigidité dans la direction X ( $k_{X1}$ ) et une faible rigidité en Y ( $k_{Y1}$ ). (iii) flexure 2 possédant une grande rigidité dans la direction Y ( $k_{Y2}$ ) et une faible rigidité dans la direction X ( $k_{X2}$ ). D : support à lame de rasoir. Flèche rouge : direction de vibration de la lame de coupe. Flèche verte : direction de la coupe.

Pour retirer une section de tissu d'un échantillon, il faut d'abord mettre le moteur rotatif en marche avec une fréquence de rotation de 60 Hz. L'arbre de la pièce A étant désaxé de  $800\mu\text{m}$ , ceci se traduira par un mouvement d'une amplitude de 1,6 mm pour la lame. Par la suite, l'échantillon est avancé par un moteur à déplacement linéaire vers la lame dans la direction de la coupe (flèche vert Figure 3.8) à une vitesse de 1 mm/s.

### 3.2.2 Préparation des tissus biologiques

Toutes les procédures chirurgicales furent acceptées par le comité d'éthique en expérimentation animale de l'Institut de Cardiologie de Montréal et sont en accord avec les recommandations du conseil canadien de protection des animaux. Dans le cadre de ce projet, le modèle animal étudié était la souris. Pour extraire les organes à étudier de l'animal (cœur et/ou cerveau), il faut d'abord anesthésier la souris en la plaçant dans une chambre à induction contenant un mélange d'oxygène pur et d'isoflurane (4%). Une fois l'animal endormi, il est sorti de la boîte à induction et étendu sur le dos sur une serviette absorbante afin d'exposer sa cage thoracique. Un masque amenant le même mélange d'oxygène et d'isoflurane, à une concentration augmentée à 5%, permet de maintenir l'animal profondément anesthésié. Un test de réflexe à une patte arrière permet de confirmer l'état d'anesthésie profond de la souris. Une ouverture sous la cage thoracique permet d'insérer une aiguille 28G dans l'apex du cœur pour en faire une perfusion transcardiaque. Un pousse-seringue permet d'injecter, à un débit 2 mL/min, 30 mL d'un tampon phosphate salin (PBS) mélangé à 0,2 mL d'héparine. Ce mélange agit comme anticoagulant. Par la suite, 30 mL d'une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4% dans du PBS, agissant comme agent de fixation, est perfusé au même taux de 2 mL/min. L'organe d'intérêt est ensuite disséqué et entreposé dans une solution de PFA 4% jusqu'au moment de la préparation du bloc d'agarose pour l'imagerie.

Le montage développé permet d'imager des tissus biologiques ayant des origines multiples. Au travers de collaborations avec des chercheurs externes, des tissus provenant de souris, rats, porcs et même des tissus humains ont été imagés. Différents protocoles pour l'extraction des tissus ont été utilisés par les différents laboratoires de recherche, mais tous ont été fixés dans le PFA et le protocole pour la préparation du bloc d'agarose est resté le même indépendamment de l'origine du tissu.

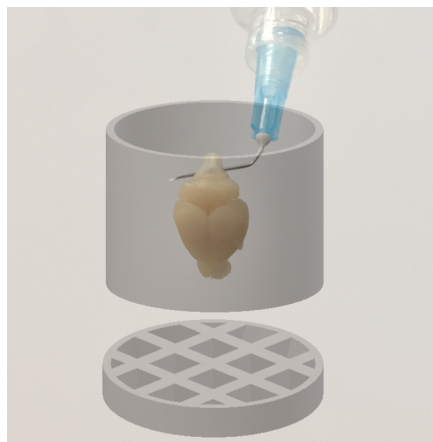


Figure 3.9 : Moule pour le bloc d'agarose. Le tissu est maintenu en suspension à la verticale dans le moule à l'aide d'une aiguille qui est piquée idéalement dans une région non imagée telle que le tronc cérébral. La partie du haut et du bas du moule sont fixées ensemble avec du ruban adhésif pour sceller lorsqu'on remplit le moule d'agarose.

L'utilisation d'un vibratome pour trancher le tissu permet d'éviter des manipulations complexes et dures pour le tissu, telles que la déshydratation et la cryo-congélation, souvent utilisées pour le tranchage au microtome. Ici, les tissus fixés dans le PFA sont simplement ancrés dans un gel d'agarose oxydé (Ragan et al. 2012). L'oxydation permet de maintenir le tissu solidement ancré dans la matrice d'agarose. La poudre d'agarose, en suspension dans l'eau, est oxydée en dissolvant 10 mM de sodium periodate pendant 2 heures à température ambiante, décantée trois fois à l'aide d'une centrifugeuse et suspendue dans le PBS pour amener la concentration finale d'agarose à 4%. La solution est ensuite portée à ébullition pour dissoudre l'agarose. Entre temps, le tissu d'intérêt est suspendu dans un moule cylindrique (Figure 3.9), dans lequel on verse l'agarose tiède ( $\sim 45^\circ\text{C}$ ). Une fois que l'agarose atteint la température ambiante et qu'il se solidifie, on retire la partie du haut du moule. Les liens covalents entre la surface du cerveau et l'agarose sont activés en équilibrant le bloc d'agarose dans 1% de sodium borohydrate dans une solution tampon de borate de sodium. (0,05 M, pH 9,0 – 9,5) brassée pour deux à quatre heures à température ambiante. Les liens covalents de l'interface cerveau-agarose sont importants pour maintenir le cerveau solidement ancré lors de la coupe. L'échantillon dans sa matrice d'agarose est maintenant prêt pour l'imagerie.

### 3.3 Plateforme d'histologie massive combinant OCT et vibratome

Connaissant les bases du fonctionnement de l'OCT et du sectionnement du tissu par vibratome, on peut maintenant voir comment la combinaison des deux technologies peut permettre l'acquisition automatique d'un tissu biologique ayant une taille de l'ordre du  $\text{cm}^3$ . Contrairement à l'histologie classique, le système n'image pas la section de tissu coupé, mais plutôt la section de tissu exposé de l'échantillon, appelé *block-face microscopy*.

#### 3.3.1 Préparation de l'acquisition

Avant de démarrer l'acquisition, quelques manipulations doivent être accomplies par l'utilisateur. D'abord, le bloc d'agarose doit être préparé suivant la procédure décrite à la section 3.2.2. La base du bloc échantillon doit ensuite être collé au centre d'un bac de (20 x 15 x 10) cm dans les directions X, Y et Z respectivement (se référer à la Figure 3.10.A pour l'orientation des axes). Ce bac est rempli d'eau pour empêcher que le bloc d'agarose ne se déshydrate. L'eau qui submerge le bloc d'agarose facilitera aussi la chute au fond du bac de la fine couche de tissu et d'agarose lors de la coupe au vibratome. Une fois le bloc d'agarose en place, l'utilisateur doit visser le bac d'eau sur un système de deux moteurs linéaires (T-LSR, Zaber) placés à angle droit permettant un déplacement en X et Y, ainsi qu'un moteur à translation verticale (L490MZ-M, Thorlabs). L'utilisateur peut maintenant générer quelques coupes pour faire en sorte d'exposer une première surface de tissu, d'où débutera l'acquisition. Puisque la lame du vibratome se trouve toujours à la même position en X, Y, Z et que le bloc d'agarose est toujours fixé au centre du bac d'eau, les paramètres de coupe sont préétablis : l'échantillon se déplace vis-à-vis la lame de coupe en X-Y, par la suite le vibratome se met en marche et le moteur X avance l'échantillon vers la lame tel que décrit à la section 3.2.1. Après avoir enlevé une section de tissu, l'échantillon revient à sa position initiale, puis effectue un déplacement vertical vers le haut de  $200\mu\text{m}$ . La coupe suivante aura donc une épaisseur équivalente, soit  $200\mu\text{m}$ . Cette épaisseur de coupe donne le meilleur compromis entre la réduction du nombre de coupe pour réduire le temps d'acquisition et éviter d'imager trop en profondeur où l'atténuation et la dispersion domine le signal. Après chaque tranchage, le système met à jour la hauteur de coupe. Après que l'agarose recouvrant le tissu ait été retirée par coup de  $200\mu\text{m}$ , l'utilisateur choisit les deux coins opposés d'un rectangle (points *i*

et  $f$ , Figure 3.10.B) en X-Y à l'intérieur duquel les données volumétriques seront acquises (Figure 3.10.B) et choisit un nombre de tranches de  $200\mu\text{m}$  à imager. Une fois ces paramètres établis, l'acquisition sans intervention humaine peut débuter. Le tout est contrôlé à l'aide d'une application développée en MATLAB.

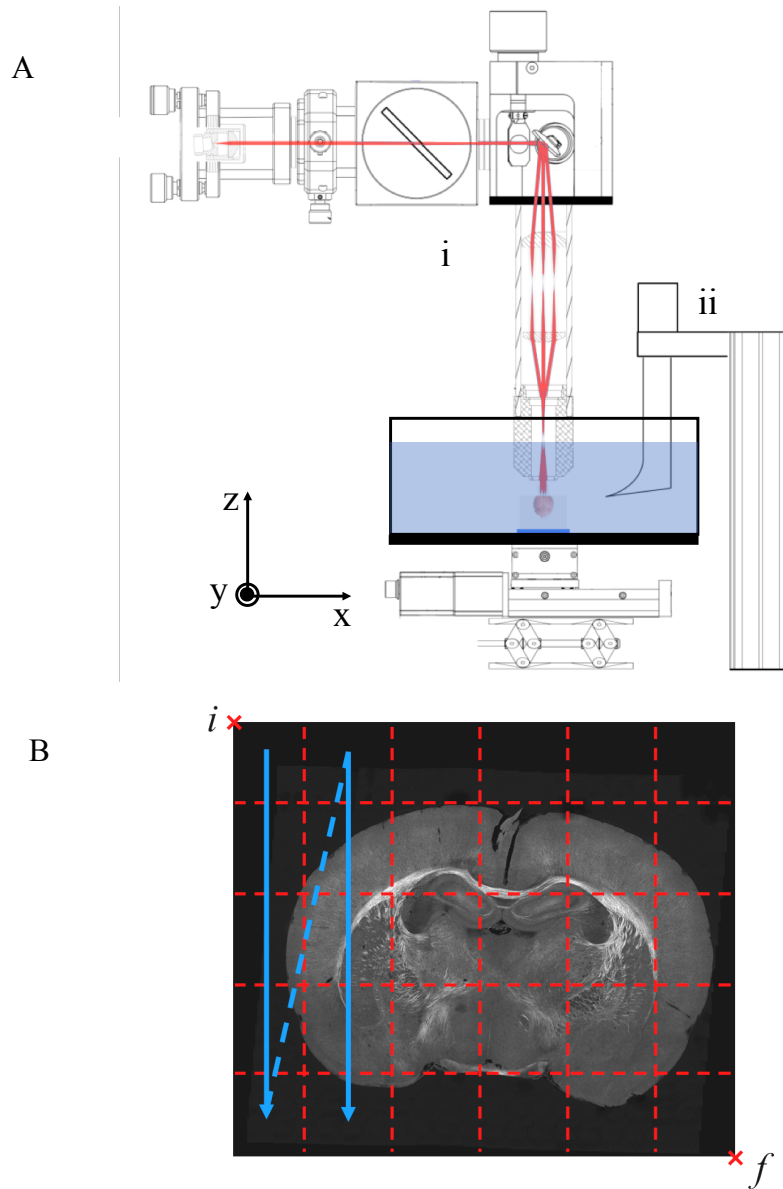


Figure 3.10 : Plateforme d'imagerie combinant OCT et vibratome. A : montage représentant le bras échantillon du microscope (i) ainsi que le vibratome (ii). L'échantillon, installé dans un bac rempli d'eau peut bouger par rapport à l'objectif et à la lame du vibratome à l'aide de trois moteurs X, Y, Z. B : Schématisation d'une section à imager. Le quadrillé pointillé représente les tuiles de  $2,5 \times 2,5$  mm à imager. Les flèches pleines en bleus indiquent l'ordre dans lequel les tuiles sont acquises. Le point initial  $i$  et le point final  $f$  spécifiés par l'utilisateur délimitent la région à imager.

### 3.3.2 Procédure d'acquisition

Une fois l'acquisition démarrée par l'utilisateur, les moteurs X-Y déplacent l'échantillon pour que le centre, mesuré à partir des points  $i$  et  $f$  établis par l'utilisateur, se place sous l'objectif de microscope. De là, une ligne-B est acquise par l'OCT et un algorithme détermine la position de l'interface eau-tissu dans l'interférogramme. Cette algorithme moyenne la ligne-B en une seule ligne-A et détermine la profondeur où le changement d'intensité est le plus grand. Avec une position du point focal déjà connue par le système, le moteur en Z se déplace pour positionner le focus de l'objectif à 100  $\mu\text{m}$  sous la surface du tissu et enregistre la position en Z du point focal. Par la suite, avec les positions  $i$  et  $f$  données par l'utilisateur ainsi que la taille d'un champ de vue pour chaque volume OCT, soit  $2.5 \times 2.5 \text{ mm}^2$ , la section est subdivisée en tuiles qui seront imagées successivement en déplaçant l'échantillon par rapport à l'objectif de microscope (Figure 3.10.B). Les tuiles adjacentes se recoupent de 20% pour faciliter le recollage des tuiles entre elles. Une fois la section imagée en entier, l'échantillon revient à la position X, Y, Z utilisée pour la coupe précédente et le vibratome retire une section de 200 $\mu\text{m}$ , avant de revenir sous l'objectif. La section coupée tombe au fond du bac d'eau et une nouvelle section de tissu est maintenant exposée et prête à être imagée. Une nouvelle hauteur pour la coupe est enregistrée, à 200 $\mu\text{m}$  au-dessus de la dernière. Ensuite, on revient à la position focale déterminée précédemment par l'algorithme détectant l'interface, additionné de 200 $\mu\text{m}$ . L'algorithme replace précisément le point focal à 100 $\mu\text{m}$  sous la surface et recommence à imager la section de tissus. Ce processus se répète autant de fois que le nombre de sections demandées par l'utilisateur.

Considérant le temps d'acquisition et de prétraitement de chaque volume ( $\sim 8$  secondes), le temps de déplacement entre chaque tuile ( $\sim 1$  seconde), multiplié par le nombre de tuiles par section ( $6 \times 5$  en moyenne pour un cerveau de souris) ainsi que le temps de coupe, le système nécessite en moyenne 5 minutes pour imager chaque section. En multipliant par le nombre de sections (60 sections pour imager sur 12mm), il faut considérer environ 5 heures pour imager un cerveau de souris en entier. Ce temps d'acquisition sera grandement dépendant des points  $i$  et  $f$  choisis par l'utilisateur. Par exemple, une mosaïque de  $7 \times 6$  tuiles, par exemple, prendra 1.4 fois plus de temps. Évidemment, la taille de tissu, donc l'organe et l'espèce est aussi un facteur déterminant du temps d'acquisition.

Les volumes OCT sont enregistrés sur le disque dur avec la nomenclature suivante :

volume\_xXX\_yYY\_zZZ.bin

où XX, YY et ZZ sont remplacés par des indices spécifiant la position en trois dimensions du volume OCT. Cette étiquette sera utilisée lors de l'étape de reconstruction des volumes tridimensionnels.

### 3.4 Reconstruction des volumes en 3D

Chaque tuile volumétrique acquise avec l'OCT donne un aperçu sur une petite région de l'échantillon. En assemblant l'ensemble des tuiles, on peut avoir un aperçu de l'organe en entier. D'abord, un modèle de déplacement des moteurs XY est utilisé pour estimer la position de chaque tuile dans la mosaïque. Les paramètres utilisés pour estimer la position de chaque tuile sont : l'angle entre les moteurs X et Y qui s'approche, mais qui n'est pas exactement 90° (1), l'angle entre l'axe du moteur X et l'axe X de balayage du laser (2) et le recoupement des tuiles adjacentes (3). Les paramètres du modèle de déplacement sont estimés en calculant le recalage des tuiles adjacentes. Une fois les paramètres déterminés, on peut estimer le positionnement XY des tuiles à l'intérieur d'une section de tissus. En utilisant le modèle de déplacement des tuiles plutôt que de directement recoller les tuiles en utilisant le décalage par rapport aux voisins, cela permet d'éviter les erreurs causées par le bruit et lorsqu'il y a absence d'information dans les images, tel que lorsqu'on image dans l'agarose. Le modèle permet aussi de déterminer la position des tuiles à de multiples résolutions.

Par la suite, les tuiles OCT sont assemblées dans une mosaïque en procédant à une fusion pondérée des images dans la mosaïque suivant :

$$M'(x, y) = \alpha(x, y)I(x, y) + (1 - \alpha(x, y)) M(x, y) \quad (3.5)$$

où  $M(x, y)$  représente la mosaïque,  $I(x, y)$  la tuile à ajouter dans la mosaïque et  $\alpha(x, y)$  le poids de la fusion, obtenu en résolvant l'équation de Laplace  $\nabla^2 \alpha(x, y) = 0$ .

Finalement, les sections de tissus sont recollées entre elles pour compléter la reconstruction tridimensionnelle du tissu. Le décalage entre les sections est déterminé par corrélation de phase et



la même technique de fusion est utilisée que pour le recollage X-Y. Dû à l'atténuation de la lumière dans les tissus biologiques, l'intensité du signal OCT est dépendante de la profondeur. Ainsi, on utilise plutôt le gradient des tranches au lieu des données en réflectivité de l'OCT pour le calcul de corrélation de phase. L'intensité du signal dans la carte tridimensionnelle de la réflectivité de l'OCT est affectée par l'atténuation et la diffusion dans les tissus et aussi par la fonction d'étalement du point focal (PSF) de l'objectif de microscope. Cet effet est d'abord compensé en modélisant la PSF extraite à partir d'un volume d'agarose :

$$h(z) = \left[ \left( \frac{z - z_f}{z_R} \right)^2 + 1 \right]^{-1} \quad (3.6)$$

où  $z$  est la profondeur,  $z_f$  la profondeur du plan focal et  $z_R$  la longueur de Rayleigh. Chaque ligne-A a été compensée par cette PSF modélisée pour compenser la perte de signal dû à l'éloignement du point focal. Ensuite, un modèle de simple diffusion (Hohmann et al. 2015; Vermeer et al. 2014) est utilisé pour estimer le coefficient d'atténuation local du tissu. L'atténuation à une profondeur  $i$  est donnée par:

$$\hat{u}(i) = \frac{1}{2\Delta z} \log \left[ 1 + \frac{I(i)}{\sum_{j=i+1}^{\infty} I(j)} \right] \quad (3.7)$$

où  $\Delta z$  est la résolution axiale de l'OCT et  $I$ , l'intensité du signal. Finalement, en utilisant la loi de Beer-Lambert on peut mesurer l'atténuation relative à chaque point dans la coupe tel que :

$$B(x, y, z) = e^{-2 \int_0^z u(x, y, z) dz} \quad (3.8)$$

Qu'on utilise pour normaliser les données :

$$I'(x, y, z) = \frac{I(x, y, z)}{B(x, y, z)} \quad (3.9)$$

La Figure 3.11 montre un exemple d'une reconstruction 3D d'organes organe de souris acquis avec le système d'acquisition et reconstruit selon la procédure décrite précédemment.

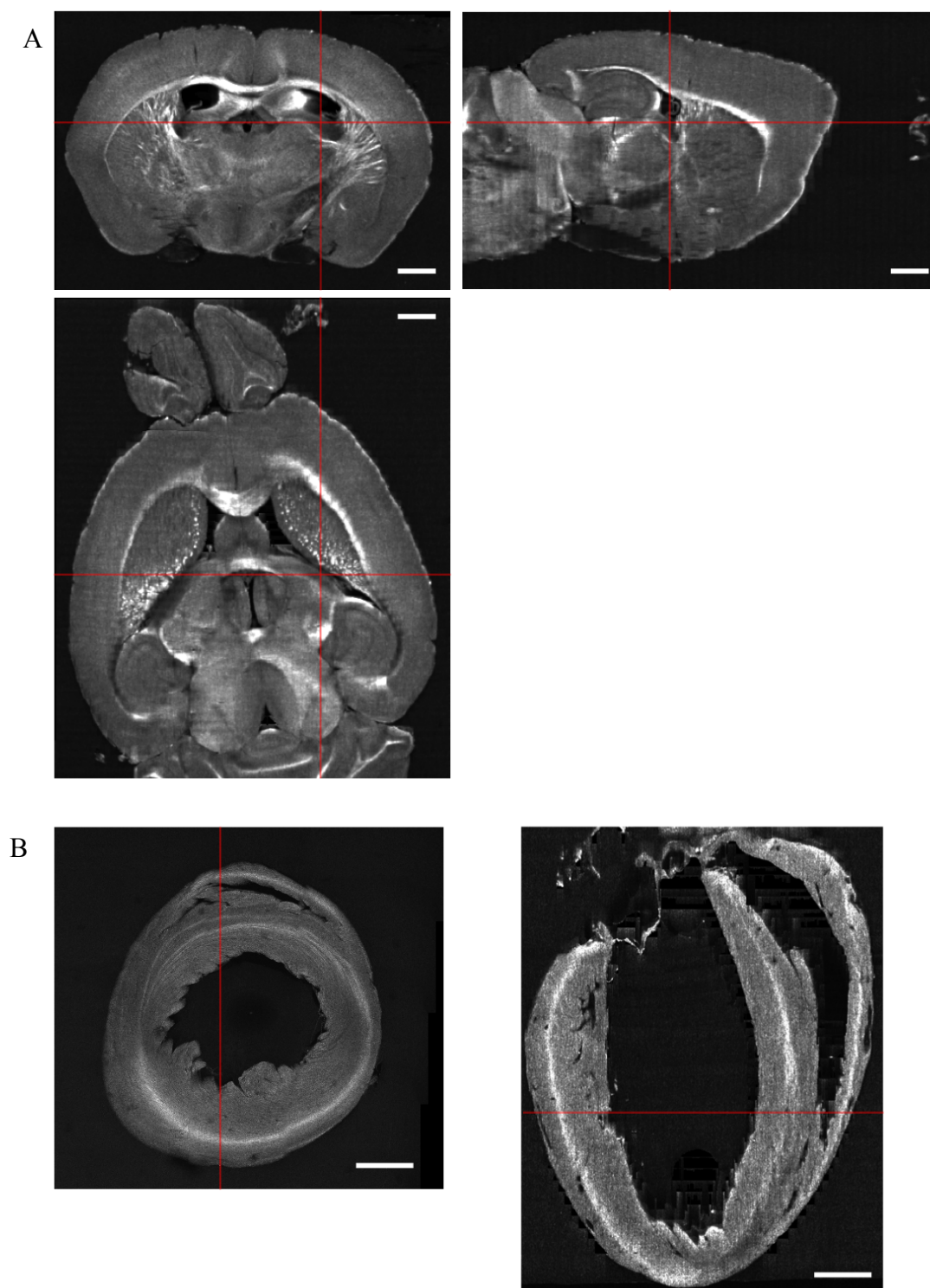


Figure 3.11 : Exemple de reconstruction 3D de jeux de données OCT. A : Cerveau de souris. Taille du volume reconstruit : (7,3 x 10,4 x 12,62) mm. B : Cœur de souris. Taille du volume reconstruit : (6,8 x 7,3 x 9,1) mm. Les traits rouges représentent les axes de visualisation dans les plans orthogonaux. Échelle : 1mm.

## CHAPITRE 4     ARTICLE 1 : COMPARING 3D SERIAL OPTICAL COHERENCE TOMOGRAPHY HISTOLOGY TO MRI IMAGING IN THE ENTIRE MOUSE BRAIN

Ce premier article est en lien avec le second objectif établi de cette thèse. Une population de cerveaux de souris a été imagée avec le microscope tomographique sériel, résultant en une matrice 3D du cerveau de la souris présentant un contraste endogène aux tissus cervicaux. En utilisant des outils de normalisation développés spécifiquement pour l'IRM, un cerveau moyen a été construit, montrant un fort contraste de la matière blanche. Pour évaluer la déformation du tissu causée par l'imagerie sérielle, les cerveaux ont préalablement été imagés *in vivo* et des analyses morphométriques entre les modalités d'imagerie ont été utilisées pour quantifier les déformations. Cet article a été soumis à la revue *Journal of Biomedical Optics* le 21 juin 2017.

*Authors* : Alexandre Castonguay<sup>1</sup>, Joël Lefebvre<sup>1</sup>, Philippe Pouliot<sup>1,2</sup>, Frédéric Lesage<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>École Polytechnique de Montréal, C.P. 6079, Succ. Centre-ville, Montréal QC, Canada H3C3A7

<sup>2</sup>Institut de Cardiologie de Montréal, 5000 rue Bélanger Est, Montréal, QC, Canada H1T1C8

*Abstract* : An automated serial histology setup combining Optical Coherence Tomography (OCT) imaging with vibratome sectioning was used to image eight wild type mouse brains. The datasets resulted in thousands of volumetric tiles resolved at a voxel size of (4.9x4.9x6.5)  $\mu\text{m}^3$  stitched back together to give a 3D map of the brain from which a template OCT brain was obtained. To assess deformation caused by tissue sectioning, reconstruction algorithms and fixation, OCT datasets were compared to both *in vivo* and *ex vivo* MRI imaging. The OCT brain template yielded a highly detailed map of the brain structure, with a high contrast in white matter fiber bundles and was highly resemblant to the *in vivo* MRI template. Brain labelling using the Allen brain framework showed little variation in regional brain volume between imaging modalities with no statistical differences. The high correspondence between the OCT template

brain and its in vivo counterpart demonstrates the potential of whole brain histology to validate in vivo imaging.

*Keywords* : Serial histology, Optical Coherence Tomography, Brain spatial normalization

## 4.1 Introduction

Light *microscopy* remains the main tool used to investigate cellular structure. Over the past decades, advances in this field gave rise to new imaging techniques (Kremer et al. 2015; Fu et al. 2008; Wang, Lenglet, and Akkin 2015; Price et al. 2006), generating new contrast information at the cellular level. To this day, microscopic imaging of cellular tissue, commonly termed histology, remains the gold standard for histopathologists. While histology has had tremendous impact on our understanding of the brain anatomy and function, observation under a microscope of a thin slice of tissue gives a very poor representation of the whole organ. There is an increasing consensus among brain scientists towards the importance of neuronal pathways between brain regions to understand neurodegenerative diseases and brain injury (Kitamura et al. 2013; Miyata et al. 2007; Wang et al. 2007; Schmitt et al. 2011; Nair et al. 2013). Serial histology to obtain large tissue section datasets is becoming essential to help bridge spatial scales between imaging at the cellular level and morphology at the millimeter scale.

This need was demonstrated with the Big Brain initiative (Amunts et al. 2013), where 7400 histological slides of a single human brain were cut, digitized and stitched back together to yield an entire brain resolved at  $20\mu\text{m}$  and totalling 1TB of data. However this was a labour-intensive work, where each slice was manually placed on glass plates and corrected for cutting defects. Recent developments of automatic tools combined with microscopy allowed to overcome the need for manual operations, thus drastically reducing acquisition time. For example, MOST (Li et al. 2010) was introduced to automatically image entire mouse brains at a resolution of  $(0.33 \times 0.33 \times 1) \mu\text{m}^3$ . While these techniques are important advances in bridging micrometric microscopy and whole brain imaging, they also include limitations. Indeed, they are based on the imaging of cut tissue sections. In turn, sectioning leads to deformation and loss of tissue in the axis transverse to the movement of the cutting blade, making it difficult to recover the three-dimensional topology. Moreover, depth subsampling, typically resulting in a resolution equal to

the thickness of the cut, makes it difficult to properly represent the tissue in three dimensions. These difficulties can be overcome by combining vibratome sectioning to cut fresh tissue with depth resolved imaging techniques such as optical coherence tomography (OCT) (Wang, Zhu, and Akkin 2014; Wang et al. 2011) or two-photon microscopy (Oh et al. 2014; Ragan et al. 2012).

With the acquisition of whole brains at the micron scale, there is a growing interest to correlate these datasets rich in information to *in vivo* MRI imaging. For this, further validation is required to confirm that vibratome sectioning of tissue does not significantly alter the tissue's morphology. Moreover, tissue fixation is known to induce deformations in biological tissues with deformation varying widely dependent the fixation procedure used and the duration of fixation (Wehrl et al. 2015; Weisbecker 2012). For instance, the absence of transcardial perfusion in mice will result in a slow diffusion of fixative in the brain, which could result in anisotropic deformation. Also, dehydration of tissue preceding microtome sectioning can also lead to considerable deformation. An evaluation of deformation produced by these serial histology techniques is necessary in order to correlate whole brain histology with *in vivo* MRI.

With the goal of evaluating such deformations, we developed a large scale motorized Optical Coherence Tomography (OCT) scanner that is able to sequentially slice through agarose embedded tissue. The developed imaging platform, which we named the slicer in this work, allows to image large sections of exposed intact tissue, before removing a thin slice with a vibratome to expose new tissue. Post-processing algorithms are then used to reconstruct a 3D dataset of entire small animal organs.

To measure deformation caused by fixation, serial sectioning and to validate reconstruction algorithms, we imaged mouse brains with three distinct acquisitions. First, *in vivo* MRI datasets were acquired in anesthetized mice, followed by *ex vivo* MRI imaging of the same brains. The brains were then embedded in agarose blocks and imaged with the OCT serial scanner. With OCT, brain tissue displayed high contrast in white matter due to changes of the refractive index in white matter fiber tracts (Ben Arous 2011; Jeon et al. 2006; Wang et al. 2011). Despite the fact that signal intensity originating from white matter was highly dependent on fiber tract orientation, coregistration to MRI was feasible and robust. In this work we adapted an automatic and standardized pipeline workflow, based mainly on the Advanced Normalization Tools (ANTs) (B.

B. Avants et al. 2011), to perform groupwise and individual comparison between imaging modalities. Anatomical MRI imaging methods that have been used to study brain morphology, such as cortical thickness and anatomical labelling were applied to OCT imaging to compare modalities for deformations.

More specifically, in this work, we imaged a group of brains using serial histology and used MRI image processing tools to perform statistical group analysis on these large histological datasets of entire mouse brains. Our results show that there is no significant deformation produced by the different stages of brain tissue manipulation (fixation and slicing). To our knowledge, this is the first attempt at registration of whole organ histology to MRI volumes, opening the way for studies accessing microscopic validation of *in vivo* MRI observations. We also compute for the first time an average brain atlas based on OCT reflectivity, that can be used to find new insight to white matter contrast in OCT.

## 4.2 Materials and methods

### 4.2.1 In vivo measurements

A total of N=8 male 3-month-old C57Bl/6 wild type mice were used for this study. The Animal Research Ethics Committee of the Montreal Heart Institute approved all surgical procedures, which were performed according to the recommendations of the Canadian Council on Animal Care. Mice were anesthetized with isoflurane (2%) and imaged in a 7T MRI (Agilent 7T-30), equipped with a 12 cm inner diameter gradient coil insert (gradient strength 600 mT/m, rise-time 130  $\mu$ s), with a true fast imaging with steady state precession sequence (TFISP, (Bowen, Gati, and Menon 2006)), using a volume coil for transmission and head surface coil for reception (Rapid Biomedical, Germany). TR/TE=6.0/3.0 ms, 256 x 256 x 192 matrix, with a longitudinal readout direction, 18 x 18 x 13.5 mm FOV for a nominal 70  $\mu$ m isotropic resolution, with FA=35°, 4 frequency shifts and 6 averages for a 120 min scan duration. To account for potential deformation due to gradient calibration, voxel size was further calibrated using a phantom of known size and measured at 77  $\mu$ m.

## 4.2.2 *Ex vivo* measurements

One week following *in vivo* imaging, mice were sacrificed to extract the brain. They were first anesthetized under 2% isoflurane and transcardially perfused with 20ml of saline, followed by a mixture of 4% paraformaldehyde mixed with 1% gadolinium at a rate of 2ml/min. For *ex vivo* MRI imaging, four brains were extracted from the skull while the four others were left in the cranium and placed in a degassed Fomblin solution to reduce undesired MRI signal from the exterior of the brain (Miller et al. 2011; Benveniste et al. 2000). The TFISP sequence was used at increased resolution, TR/TE=18/9 ms, 600 x 480 x 480 matrix, 15 x 12 x 12 mm FOV, for a nominal 25  $\mu$ m isotropic resolution, adjusted to 27  $\mu$ m with the calibration above, with FA=10°, 16 frequency shifts, no average and an 18 hour 20 min scan duration.

## 4.2.3 Serial OCT measurements

### 4.2.3.1 System operation

Two weeks after the sacrifice, the mouse brains were embedded in 4% agarose for *ex vivo* slicer imaging. Tissue samples were embedded in a cylindrical agarose block and placed underneath the microscope objective. To overcome limited light penetration in the tissue from microscopic imaging, a vibratome was used for sequential sectioning of tissue in order to reveal new tissue to image. In order to expose coronal sections of the tissue, all brains were placed with the antero-posterior axis vertically with the cerebellum facing the microscope's objective. Following the design described in (Ragan et al. 2012), a dual flexure isolated vibration of the blade with a DC motor on a one axis transverse movement provided precise cutting of fresh (unfrozen) tissue (Figure 4.1.A). X and Y stages moved the sample relative to the objective allowing to image every subregion (2,5 x 2,5 mm) of the tissue plane. After each section was imaged, a Z stage raised the sample by 200 $\mu$ m to remove a slice of equivalent thickness and the process was repeated automatically. The Z position of the sample was adjusted in order to have the focus approximately 50 $\mu$ m under the tissue surface, thus avoiding imaging of tissue deformed by slicing. For more details regarding automated serial histology, see (Ragan et al. 2012).

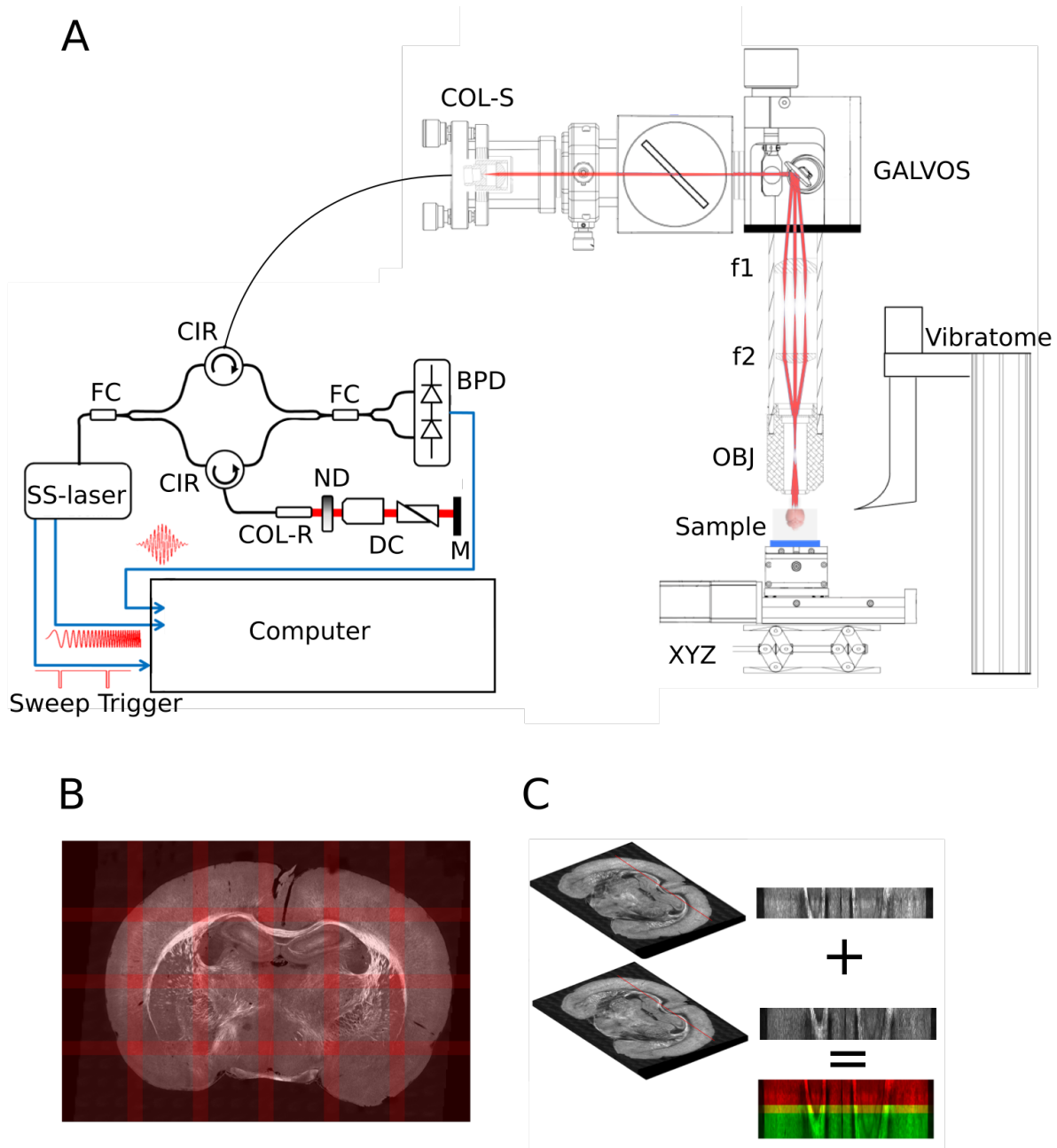


Figure 4.1 : Serial scanner overview. **A**. Microscopic imaging platform. The fibered swept-source OCT enters the microscope at COL-S. Galvanometric mirrors (GALVOS) allow light passing thru a telescope ( $f_1=35\text{mm}$  and  $f_2=100\text{mm}$ ) and 3x objective (OBJ) to scan the surface of the sample. X,Y and Z stages (XYZ) allow movement of the sample relative to the objective and cutting  $200\mu\text{m}$  slices with a vibratome. Right side of (A) shows the OCT setup. SS-Laser : swept-source laser; FC : fiber coupler; CIR circulator; COL-R : collimator for reference arm; ND : neutral density filter; DC : dispersion compensation glass; M : mirror; BPD : balanced photodetector; COL-S : collimator for sample arm. **B**. Slice assembly. Each tile is stitched by assembling individual tiles. A 20% overlap between neighboring tiles (red label) was fused using a Laplace blending. **C**. Tissue slices stitching. Each reconstructed slice has a thickness of  $260\mu\text{m}$ . Considering cuts at every  $200\mu\text{m}$ , there is an  $60\mu\text{m}$  overlap between slices.



### 4.2.3.2 Optical setup

Data acquisition was performed using a custom-made fibered optical coherence tomography scanner. The OCT system uses a swept-source laser (Axsun, 1310 Swept Source Engine) with an output power of 18mW. The central wavelength of the laser is  $\lambda = 1310\text{nm}$  with tuning bandwidth of  $\Delta\lambda = 100\text{nm}$ . A 50 kHz sweeping rate enabled high-speed imaging. Light exiting the fiber in the sample arm was deflected by X and Y galvanometers before passing through a telescope ( $f_1 = 35\text{mm}$  and  $f_2 = 100\text{mm}$ ) to enlarge the beam diameter at the entrance of the pupil of a 3x telecentric air objective (Thorlabs, LSM04), giving a lateral resolution of  $8\mu\text{m}$  in water. A custom-made coverslip was added between the objective lens and the sample in order to avoid water ripples and maintain a constant water column length in the sample arm of the OCT. The addition of a variable thickness of glass in the reference arm was necessary to compensate dispersion caused by lens and water in the sample arm. Axial resolution was measured at  $10\mu\text{m}$  in water. Individual OCT volumetric datasets were composed of 1152 points per A-line, 512 A-lines per B-scan and 512 B-scans per C-scan, resulting in a OCT volume in a little over 5 seconds. During acquisition, volumetric data was discarded for depths over  $780\mu\text{m}$  due to out of focus effects and high signal attenuation. The use of a low magnification microscope objective and rapid imaging with a swept-source OCT enabled imaging entire mouse brains within approximately 8 hours.

## 4.2.4 Data processing

### 4.2.4.1 OCT data reconstruction

The first reconstruction step was to transform the volumes to isotropic voxels and to correct for optical artifacts introduced by the objective. A displacement model of the motorized stage was then used to estimate each tile position within the mosaic. This model considered the angle between the X and Y motors, the angle between the motor axes and the laser scanning plane, and the overlap size between neighboring tiles. The model parameters were estimated from the data by computing the phase-correlation based pairwise registration of all neighboring tiles within the mosaic and by inverting the model, solving for each parameter. Using this method, the individual tile XY position within each slice was obtained.

The next step was to stitch together the volumes for each slice (Figure 4.1.B). This was done using linear blending to fuse overlapping tiles:

$$M'(x, y) = \alpha(x, y)I(x, y) + (1 - \alpha(x, y))M(x, y) \quad (4.1)$$

where  $M(x,y)$  is the mosaic,  $I(x,y)$  is a tile and  $\alpha(x,y)$  is the spatially varying blending weights, obtained by solving the Laplace equation  $\nabla^2\alpha(x,y) = 0$  with Dirichlet boundary conditions over their overlap region. This was proven adequate for complex overlap geometries and ensuring a smooth transition between neighboring tiles. The last reconstruction step was to stitch the slices together in the Z direction to get a complete 3D volume (Figure 4.1.C). This was done by computing the shift between adjacent slices using the cross-correlation of their 2D image gradient magnitude and using the same blending method as for the XY stitching. This reconstruction resulted in a 3D map of the brain tissue optical reflectivity at a microscopic resolution.

The OCT reflectivity data was affected by a depth-dependent signal attenuation due to the microscope's confocal point-spread function (PSF) and to tissue scattering and absorption. To compensate this effect, the PSF was first extracted from the surrounding agarose using a Gaussian beam model:

$$h(z) = \left[ \left( \frac{z - z_f}{z_R} \right)^2 + 1.0 \right]^{-1} \quad (4.2)$$

where  $z$  is the depth,  $z_f$  the focal plane depth and  $z_R$  the effective Rayleigh length. An XY invariant synthetic axial PSF was generated from the fitted model and used to remove the signal roll-off. Then, a single scattering photon model was used to estimate the tissue attenuation coefficient locally (Vermeer et al. 2013; Hohmann et al. 2015). The attenuation at a given depth  $i$  is defined as :

$$\hat{\mu}(i) = \frac{1}{2\Delta} \log \left[ 1 + \frac{I(i)}{\sum_{j=i+1}^{\infty} I(j)} \right] \quad (4.3)$$

where  $\Delta$  is the axial resolution and  $I$  the signal intensity. Finally, using the Beer-Lambert law an attenuation bias field was computed for each slice as:

$$B(x, y, z) = \exp \left[ -2 \int_0^z \hat{\mu}(x, y, z) dz \right] \quad (4.4)$$

and used to normalize the data:

$$I'(x, y, z) = \frac{I(x, y, z)}{B(x, y, z)} \quad (4.5)$$

The necessary time for the whole data reconstruction process remained under 12 hours per brain. More details regarding the OCT data reconstruction and attenuation compensation can be found in (Lefebvre et al. 2017).

#### 4.2.4.2 Brain masking

For MRI images, a bias field correction (*N4BiasFieldCorrection*) implemented in the ANTs toolkit was applied (Tustison et al. 2010) before brain masking. The primary step for subsequent analysis of data was to create an efficient brain mask, isolating the brain from surrounding tissue (*ie* skull) and background noise. For all three imaging modalities, an automatic brain extraction algorithm was written using the open source scikit-image toolbox (van der Walt et al. 2014) for reliable and repeatable masking. The brain volumes were thresholded using the Otsu method (“A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms” 1979) and underwent a morphological erosion (radius = 2). The resulting binary mask was multiplied with the original volume to initiate extraction using morphological snakes, an iterative contour evolution method to detect edges (Márquez-Neila, Baumela, and Alvarez 2014); (Alvarez et al. 2010). For both *in vivo* and *ex vivo* MRI, the obtained brain mask was then applied to the original brain volume and a new field bias correction was applied to the masked MRI original data to avoid contributions from non-brain tissue.

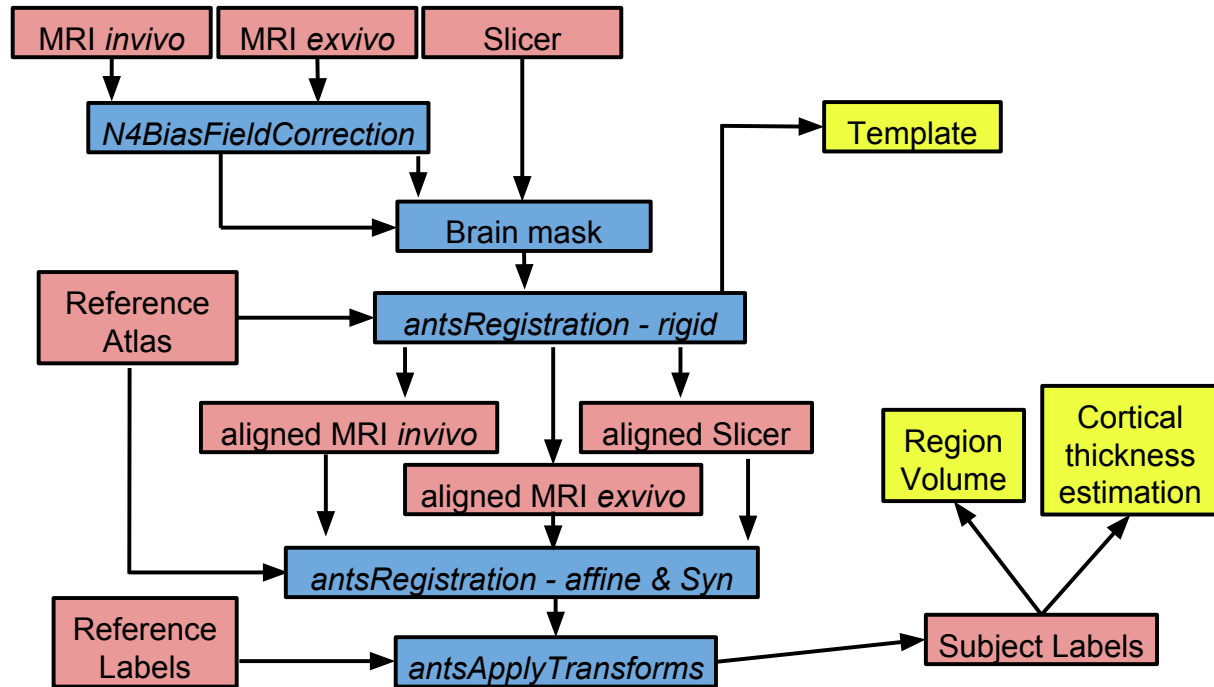


Figure 4.2 : Data processing workflow. Each MRI volumes undergoes a non-uniformity bias field correction. Volumes are then masked to extract brains and undergo a rigid transformation (translation and rotation) to be aligned in the Allen framework. The aligned brains are then used to create three templates for each imaging modality. The Allen atlas is registered to each individual aligned brain using a combination of affine and SyN transformations. Allen atlas labels are transformed to subject space and used to determine large brain region volumes and cortical thickness. Red boxes: datasets. Blue boxes: Computational processes, italic: ANTs toolbox. Yellow boxes: Outputs.

#### 4.2.4.3 Atlas registration

Brain registration was performed using the ANTs toolkit (B. B. Avants et al. 2014; B. Avants et al. 2008; B. B. Avants et al. 2011) and the anatomical Allen mouse brain atlas generated from native two photon autofluorescence features of 1675 specimens (Oh et al. 2014; Kuan et al. 2015). First, brains were aligned with a rigid transformation to the Allen atlas, which consists of a translation and a rotation of the dataset to best fit the atlas orientation. Registration of MRI and OCT brain volumes to a mouse brain atlas allowed automatic segmentation of the brains by anatomical regions instead of biased and time-consuming manual segmentation. To bring the Allen atlas in the imaged brain stereotaxic space, a series of rigid, affine and symmetric normalized (SyN) transformation, developed in the ANTs toolkit, were sequentially applied to fit

the Allen template to the individual subject stereotaxic space. Figure 4.2 summarizes the data processing workflow used for subject registration. Mutual information was used as a cost function since datasets are imaged using different modalities, thus exhibiting different contrast information. Registration was a greedy computational process and a downsampling of the OCT brains to 25  $\mu\text{m}$  isotropic voxels was necessary in order to run co-registration. They found diffeomorphic transformation was then applied to the annotation file to bring it in the measurement space, resulting in an annotation map of the specimen. To determine registration quality, each *ex vivo* MRI brains were registered to their corresponding OCT image dataset as well as their corresponding labels. By measuring the overlap of brain subregions, we were able to quantify registration quality using the Jaccard metric, defined as the size of the overlap of two volumes divided by the size of the union of the same volumes.

A population template brain for each of the three imaging modalities was computed as described in the ANTs toolkit (B. B. Avants et al. 2010). For each imaging modalities, the brain template was flipped along the mid-sagittal plane and both original and mirrored brains were averaged using the same process, having the practical effect of doubling the number of brains for the template.

#### 4.2.4.4 Cortical thickness

Cortical thickness has been used as a metric to evaluate morphological changes in various pathologies, such as Alzheimer's disease (Double et al. 1996; Kwon et al. 1999) and schizophrenia (Double et al. 1996; Kwon et al. 1999), its measure remains therefore of utmost importance. Here we used a Laplacian Thickness approach to measure cortical thickness. This algorithm uses the Laplace equation to compute equidistant lines through the cortex and to use orthogonal projections to compute cortical thickness (Jones, Buchbinder, and Itzhak 2000). Since the algorithm was optimized for human brains, input parameters were adapted to the brain size of mice (*prior thickness = 1mm, dT = 0.001*).

## 4.3 Results

The template formation allowed for *in vivo* MRI to enhance the contrast between white and gray matter (Figure 4.3.A) compared to individual acquisitions (Supplementary Figure 4.7.A). The

TFISP sequence used for *ex vivo* MRI generated banding artifacts (Supplementary Figure 4.7.B), which were significantly reduced upon template formation (Figure 4.3.B). For serial-OCT imaging, the resulting template significantly smoothes transitions between slices and fades out cutting errors to show a highly detailed map of grey and white matter (Figure 4.3.C). However certain artifacts remain apparent in the OCT brain template. As expected, high contrast appears in myelinated fiber tracts, which is not constant within a same white matter structure. Green arrows in Figure 4.3.C highlight fiber tracts where reflectivity signal varies spatially for the corpus callosum (Figure 4.3.C, left panel) and for the anterior commissure (Figure 4.3.C, right panel). Fibers running in the coronal plane appear bright as others, perpendicular to the coronal sections appear darker, consistent with previous observations (Wang, Zhu, and Akkin 2014; Leahy, Radhakrishnan, and Srinivasan 2013). The OCT reflectivity brain template was made publicly available online (Lefebvre 2017).

The resemblance of each individual sliced brain and the OCT brain template was assessed by looking at the warp fields used to pass from an original brain to the template. Warp fields resulting from the registration process provide the displacement of each voxel in three dimensions. By taking the modulus in 3D for each voxel, we obtained a map of voxel displacements. Figure 4.3.D shows a histogram of the average voxel displacement from each individual to the template for in all three imaging modalities. All three imaging modalities show a log-normal distribution. Both *in vivo* and *ex vivo* MRI imaging shows very similar profiles, with average voxel displacements of 82 $\mu\text{m}$  and 86 $\mu\text{m}$ , respectively. The larger profile of the voxel displacement for slicer imaging suggests a wider range of voxel displacement and averages at 128 $\mu\text{m}$ .

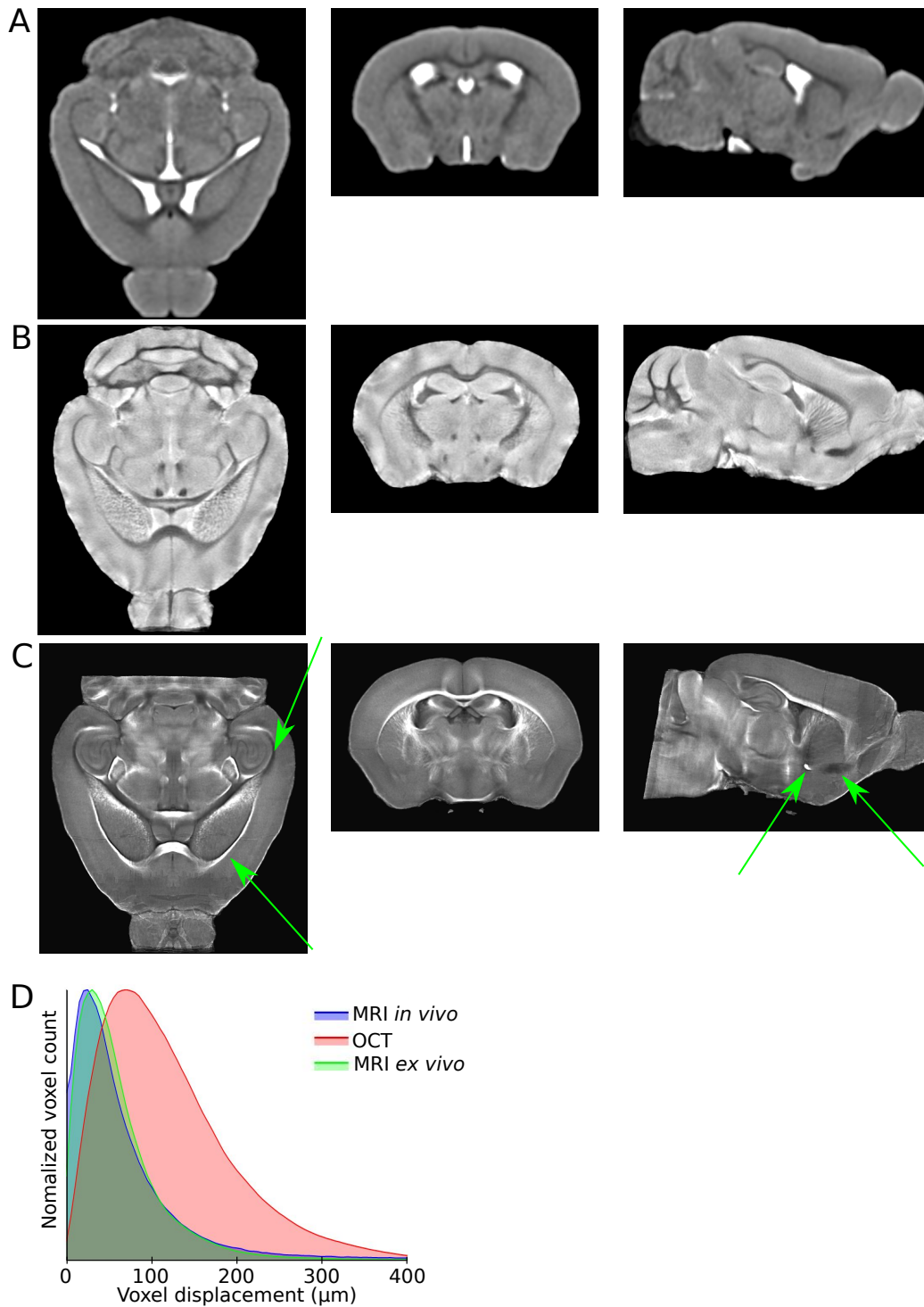


Figure 4.3 : Brain templates obtained with *in vivo* MRI (A), *ex vivo* MRI (B) and slicer imaging (C) viewed in orthogonal planes. Green arrows in (C) show white matter fiber tracts presenting different contrast within the anterior commissure (right panel) and the corpus callosum (left panel). D. Normalized voxel displacement histogram. Voxel displacement within each brain map to the template, for three imaging modalities (Blue: *in vivo* MRI, Green *ex vivo* MRI, Red: Slicer).

To check the similarity between the *in vivo* MRI and slicer templates, we used ANTs to warp one template on the other. Figure 4.4.A shows the color coded voxel displacement map between the slicer template to the *in vivo* MRI template, overlapped on a transversal section of the *in vivo* template. Largest voxel displacements appear in the olfactory bulb, the cerebellum and in the optic nerve (not shown). These areas of large displacement translate into an extended tail in the voxel displacement histogram (Figure 4.4.B), towards higher displacements. These regions are either absent or partially absent of the OCT template due to slicing difficulties in these regions. Large displacements also occur in and around ventricular areas (Figure 4.4.A) whereas low displacement occurs in grey matter areas. The average voxel displacement in the whole brain is 74 $\mu$ m.

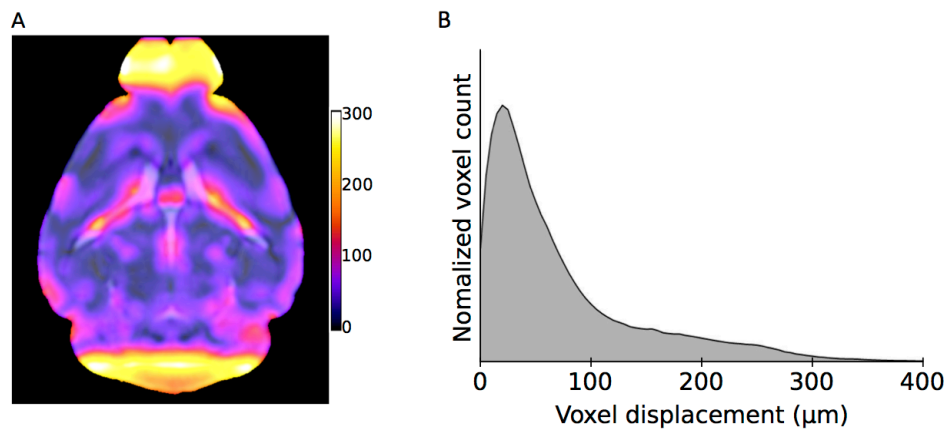


Figure 4.4 : Warp field for slicer template to *in vivo* MRI template. A. Transversal view of average voxel displacement overlapped on its corresponding transversal view of *in vivo* MRI template. Scale bar in micrometers. B. Histogram of voxel displacement from slicer template to *in vivo* MRI template.

To further investigate of the deformation between imaging modalities, we measured large brain regions volumes. Large brain regions annotation maps were aligned to subject brains (Figure 4.5.A) as described previously. Voxel counting within each region allowed estimation of volume (Figure 4.5.B). Ventricles showed the largest volume variation between *in vivo* and *ex vivo* imaging. A shrinking to  $47 \pm 15\%$  of its *in vivo* volume was observed in both *ex vivo* imaging modalities (Supplementary Figure 4.7). Other deep brain regions showed little variation in size (Table 4.1).



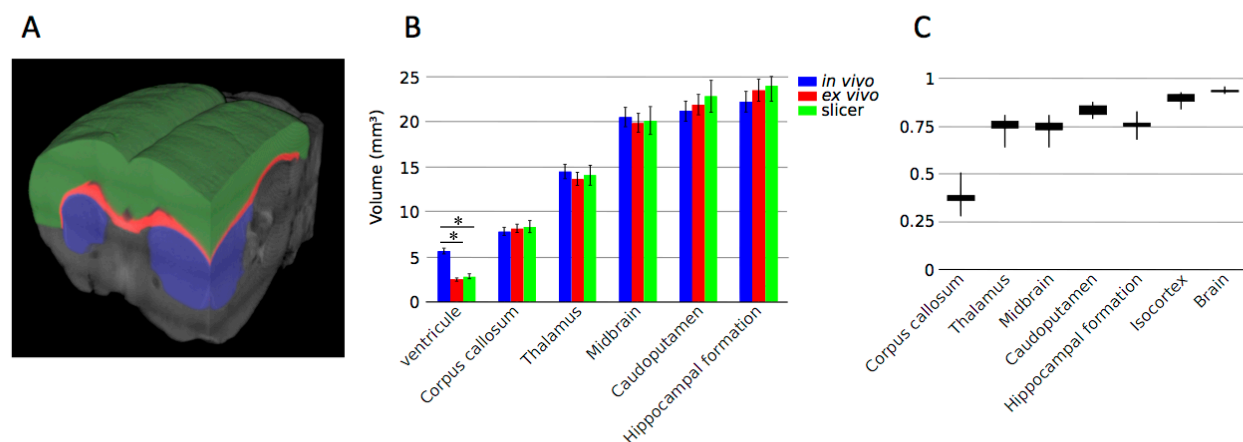


Figure 4.5 : Brain labelling. A. Slicer reconstructed brain segmented by region. Green: isocortex. Red: corpus callosum. Blue: caudoputamen. B. Volume of large brain regions measured for all eight animals with three modalities. (\*) denotes significant volume difference ( $p < 0.05$ ) Error bars represent standard deviation. C. Jaccard index showing overlap between labelled regions of MRI *ex vivo* and slicer imaged brains. Whiskers indicate the upper and lower quartiles.

Volumetric variations for all deep brain structures were comprised within error bars, defined as the standard deviation over the mean. Cortical volume remained constant between imaging modalities, as for total brain volume. Paired t-tests amongst different imaging modalities showed no significant volumetric difference between large brain regions, except for the ventricles, where a significant ( $p < 0.05$ ) volume variation was observed between *in vivo* and *ex vivo* MRI and between *in vivo* and slicer imaging.

Table 4.1 : Brain structure volumes measured with three different imaging modalities. Error represents standard deviation. \* indicates statistical difference with *in vivo* at  $p < 0.05$ .

| Brain structure        | <i>in vivo</i> MRI (mm <sup>3</sup> ) | <i>ex vivo</i> MRI (mm <sup>3</sup> ) | slicer (mm <sup>3</sup> ) |
|------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
| <b>Ventricles</b>      | 5.6±0.38                              | 2.5±0.4*                              | 2.8±0.8*                  |
| <b>corpus callosum</b> | 7.9±0.3                               | 8.2±0.5                               | 8.4±0.8                   |
| <b>thalamus</b>        | 14.5±0.4                              | 13.7±0.7                              | 14.1±1.3                  |
| <b>midbrain</b>        | 20.5±0.7                              | 19.9±0.8                              | 20.2±2.1                  |
| <b>caudoputamen</b>    | 21.2±0.7                              | 22.0±1.1                              | 22.9±2.0                  |
| <b>hippocampus</b>     | 22.3±1.2                              | 23.6±1.6                              | 24.1±2.4                  |
| <b>cortex</b>          | 113±3                                 | 113±4                                 | 114±7                     |
| <b>whole brain</b>     | 442±13                                | 452±16                                | 414±35                    |

We used the Jaccard coefficient to check whether the registrations between two datasets were adequate for brain labelling. To do so, we first aligned each *ex vivo* MRI brain to its slicer counterpart. We then applied the same transformation to the large brain region labels of *ex vivo* MRI to align them with the labels of slicer imaging. The Jaccard coefficient, which gives an index of the similarity between aligned brains, is defined as the ratio of the intersection divided by the union of two volumes:

$$J(A, B) = \frac{|A \cap B|}{|A \cup B|} \quad (4.6)$$

where A corresponds to the volume occupied by a brain region for *ex vivo* MRI and B the volume occupied of the corresponding brain region for slicer imaging. The Jaccard coefficient when overlapping MRI *ex vivo* to slicer data was smallest for the corpus callosum (0.39) and remained steady for other deep brain structures : thalamus (0.71), midbrain (0.67), caudoputamen (0.83), hippocampus (0.73) (Figure 4.5.C). The isocortex gave the highest Jaccard index amongst large brain regions, rising at 0.90. As for the whole brain volume, an average overlap of 0.94 was

observed among all eight brains.

Further investigation of the alterations induced by serial imaging was performed by computing cortical thickness. Using the labelled cortex of the mice provided in the Allen brain framework, we were able to obtain voxel-based thickness maps for the MRI and slicer imaging modalities. Thickness maps for all eight animals and three imaging modalities were spatially normalized to the slicer template for statistical comparison. Figure 4.6.A gives the average thickness map for all eight mice imaged with the slicer platform superimposed on the slicer template brain. Distinct separations of the cortex and corpus callosum is visible at the inner part of cortical map showing precise alignment of segmented cortex on template brain. Average cortical thickness was measured at 982  $\mu\text{m}$  for *in vivo* imaging, 988  $\mu\text{m}$  for *ex vivo* MRI imaging and 1026  $\mu\text{m}$  for slicer imaging. We were able to obtain a differential thickness map by subtracting the average thickness maps of the slicer to that of *in vivo* (Figure 4.6.B, left panel) and *ex vivo* MRI (Figure 4.6.B, right panel). To evaluate whether these differential maps between imaging modalities were significant, we averaged the cortical thickness over large cortical areas (eg primary motor, primary somatosensory, primary visual). A paired t-test with matching individuals showed no significant cortical thickness differences in large cortical areas between imaging MRI (*in vivo* / *ex vivo*) and slicer imaged brains.

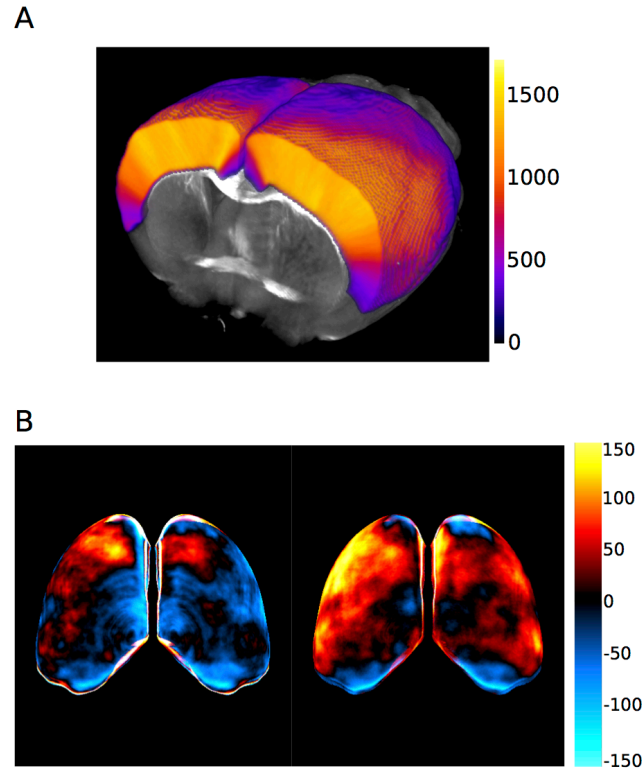


Figure 4.6 : Cortical thickness. A. Average cortical thickness of mice imaged with slicer overlapped on slicer template brain. Scale bar in micrometers B. Top view of cortical surface, showing difference in cortical thickness between slicer and *in vivo* MRI imaging (left panel), *ex vivo* MRI imaging (right panel) and slicer imaging. Blue colors represent a thinning of the slicer brain cortex, while red colors a thickening. Scale bar in micrometers.

## 4.4 Discussion

Serial sectioning and imaging proved to be an efficient means to image brain tissue at high resolution, giving a reliable representation of the *in vivo* tissue. By comparing large brain regions and whole brain volumes between *in vivo* and MRI *ex vivo* datasets, our results show that deformation caused by the fixation procedure used here is not significant compared to intra-modal variations within a time period of two weeks post-fixation. Previous work (Wehrl et al. 2015; Weisbecker 2012; Quester and Schröder 1997) has shown significant deformation caused by tissue fixation. However, our brain samples were transcidentally perfused, allowing PFA to be uniformly distributed in the brain, instead of immersion of fresh brains in PFA (Wehrl et al. 2015; Weisbecker 2012; Quester and Schröder 1997) which would result in slow and non-

uniform diffusive perfusion. Also, for *ex vivo* imaging, brains did not undergo further fixative processes, such as ethanol dehydration, which further limited tissue deformation. Trial and error has also shown that diluting a 10% PFA solution to 4% in saline has had lower impact on tissue shrinking compared to powder based PFA.

The creation of an OCT template of the mouse brain was done for the first time and shown to be feasible with standard tools used in MRI. The ANTs toolbox proved to be an adequate tool and was able to converge to an optimal template without significant tuning. However certain artifacts remain in the template brain as depicted previously. First, in the cerebellum, artefacts appear due to the folds that characterize this structure in mice. Indeed, when cutting through this structure, the many folds may not be fully supported by the agarose matrix which cannot fully penetrate in small sulci, thus leading to cutting artefacts. Also, imaging does not always begin at the exact same coronal section for individual brains. The registration algorithm will likely try to overcompensate for this absence of tissue. Indeed, the registration algorithm assumes that both images are complete and similar (i.e. they contain the same information). For example, a missing olfactory bulb in one image will be stretched to fit a complete brain, as the registration algorithm will assume that the former is only deformed and not missing. This effect can be reduced but not eliminated by using registration masks. Finally, when slicing through the anterior part of the brain, it has happened that the last portion of the brain slipped out of the agarose mold due to smaller surface contact holding the brain in place. For certain brains the most anterior part of the brain was missing, creating the shadow artefact present in the forebrain. Presumably these issues can be alleviated with improvements in tissue preparation.

Warp field analysis showed that on average, a larger deformation of individual brains was needed to transpose to the template brain for OCT imaging compared to both *in vivo* and *ex vivo* MRI imaging. This could be due to deformation caused by vibratome sectioning of the tissue. Indeed, some areas are less supported by the agarose matrix such as the cerebellum, as described previously. Also, during the acquisition, brain tissue tends to detach itself from the agarose matrix, which can cause cutting artefacts. To address this problem (Ragan et al. 2012) have oxidized agarose gels to enhance adherence with agarose. Another explanation for this large interindividual deformation could be that with slicer imaging, we do not image the exact same areas of the brain from one acquisition to another. As described above, acquisitions do not comprise the same parts of the cerebellum, sometime starting the acquisition at a more anterior

part. The same goes for the olfactory bulb. As a result, some brains will be expanded to compensate for missing tissue while others will be shrunk. Nonetheless, the average OCT brain was very similar to the MRI *in vivo* template. Areas of largest displacement from one template to another, namely the olfactory bulb, the cerebellum and optic nerve are simply not present in the OCT template. Thus, the registration algorithm compensates for the absence by stretching these areas. Large displacements, although to a lesser extent, also occur near the ventricular areas. This result corroborates with the large volumetric variations observed in ventricles when comparing *in vivo* to both *ex vivo* modalities. The intracranial pressure exercised on ventricles filled with cerebrospinal fluid maintains their shape. In the absence of intracranial pressure when performing *ex vivo* imaging, ventricles tend to collapse on themselves, explaining larger deformation. Despite these issues, anatomical measures showed no statistical differences between modalities suggesting that serial imaging could be used to assess anatomical markers.

OCT imaging in the fixed mouse brain gives rise to variable contrast in white matter, dependent on the fiber orientation, whereas grey matter contrast remains constant in all parts of the brain. When myelinated fibers run in the imaging plane of the objective, in this case parallel to coronal sections, they present a high reflectivity, represented as tissue with high intensity in the template. On the other hand, fibers oriented perpendicularly to the imaging plane will appear darker. This is particularly apparent in the caudoputamen where fibers oriented in different orientations appears with different intensity values. This particular interaction of white matter with light allowed to see the change in orientation of white fiber tracts in the posterior region of the corpus callosum and in the anterior commissure, as shown with diffuse tensor imaging (Jiang and Johnson 2010; Wu et al. 2013). Quantification of white matter tract orientation can be achieved using polarization sensitive OCT, allowing 3D fiber tracking in the whole mouse brain at a higher resolution than could be achieved in diffuse tensor imaging (Wang et al. 2014; Wang, Lenglet, and Akkin 2015). Light sheet microscopy has also been used to image whole mouse brains (Dodt et al. 2007; Schwarz et al. 2015; Tomer et al. 2014). This approach necessitates tissue clearing, which will disrupt native contrast of white and grey matter eliminating neuroanatomical features in the brain and rendering region labelling difficult. Tissue preparation needed for light sheet microscopy imposes harsh conditions to tissue and may further create deformations potentially altering the *in vivo* brain shape.

The labelling of OCT datasets was made possible by the combination of the ANTs toolbox and

the Allen mouse brain. By registering individual OCT datasets to the Allen brain, we were able to automatically segment the brain in large regions. It was unclear at first though, whether we would be able to register datasets originating from different imaging modalities, showing different contrast information. The measure of the Jaccard index in large brain regions showed that our registrations were comparable to work previously done in MRI (Klein et al. 2009; B. B. Avants et al. 2011). An exception remains for the corpus callosum, where a much lower overlap index was measured. The particular shape of the corpus callosum gives it a large surface to volume ratio, which has shown to influence greatly the Jaccard index (Rohlfing et al. 2004). The changing signal intensity of tissue within the corpus callosum can also explain poor registration.

The approach presented in this paper allows us to measure anatomical brain metrics, such as cortical thickness, in a single template space. The cortical thickness mapping relies on an adequately labelled cortex in the brain. The Jaccard index for the isocortex overlap was the highest among brain structures, confirming a robust labelling of the isocortex. The particular configuration of the isocortex, being at the surface of the brain, gives it well-defined borders which help for accurate registration to Allen brain.

## 4.5 Conclusion

In this paper, we presented an imaging platform capable of imaging entire mouse brains at microscopic resolution. The reasonable acquisition time allows imaging of large amount of samples. We obtained for the first time a template brain of a population of mice using a microscopic OCT serial scanner and showed, through the comparison of brain region volume, cortical thickness and overall brain volume, that fixation and slicing of the tissue generated little changes in brain morphology. We also demonstrate that we could register whole brain OCT datasets to MRI using image registration tools. Registration of detailed and highly resolved OCT maps to *in vivo* MRI is limited by the lack of resolution and low contrast of the latter. Accurate registration is achievable when acquiring *ex vivo* MRI, where a higher resolution and a better structural contrast is present. The combination of block-face microscopy with OCT imaging of the brain proves to be an adequate tool for reliable representation of *in vivo* brains while keeping neuroanatomical features. Such a tool opens the way for studies of observing microscopic

alterations in the whole brain amongst a large group of subjects.

### *Acknowledgments*

This work was supported by a Fonds de Recherche du Québec-Nature et Technologies (FRQ-NT) to A. Castonguay and J. Lefebvre, CIHR project grant and NSERC Discovery Grant to F. Lesage and by an NSERC Discovery Grant P. Pouliot. Authors have no relevant financial interests in the manuscript and no other potential conflict of interest.

## **4.6 References**

- Alvarez, Luis, Luis Baumela, Pedro Henriquez, and Pablo Marquez-Neila. 2010. “Morphological Snakes.” In , 2197–2202. IEEE. doi:10.1109/CVPR.2010.5539900.
- Amunts, K., C. Lepage, L. Borgeat, H. Mohlberg, T. Dickscheid, M.-E. Rousseau, S. Bludau, et al. 2013. “BigBrain: An Ultrahigh-Resolution 3D Human Brain Model.” *Science* 340 (6139): 1472–75. doi:10.1126/science.1235381.
- Avants, B. B., C. L. Epstein, M. Grossman, and J. C. Gee. 2008. “Symmetric Diffeomorphic Image Registration with Cross-Correlation: Evaluating Automated Labeling of Elderly and Neurodegenerative Brain.” *Medical Image Analysis* 12 (1): 26–41. doi:10.1016/j.media.2007.06.004.
- Avants, Brian B., Nicholas J. Tustison, Gang Song, Philip A. Cook, Arno Klein, and James C. Gee. 2011. “A Reproducible Evaluation of ANTs Similarity Metric Performance in Brain Image Registration.” *NeuroImage* 54 (3): 2033–44. doi:10.1016/j.neuroimage.2010.09.025.
- Avants, Brian B., Nicholas J. Tustison, Michael Stauffer, Gang Song, Baohua Wu, and James C. Gee. 2014. “The Insight ToolKit Image Registration Framework.” *Frontiers in Neuroinformatics* 8: 44. doi:10.3389/fninf.2014.00044.
- Avants, Brian B., Paul Yushkevich, John Pluta, David Minkoff, Marc Korczykowski, John Detre, and James C. Gee. 2010. “The Optimal Template Effect in Hippocampus Studies of



- Diseased Populations.” *NeuroImage* 49 (3): 2457–66. doi:10.1016/j.neuroimage.2009.09.062.
- Ben Arous, Juliette. 2011. “Single Myelin Fiber Imaging in Living Rodents without Labeling by Deep Optical Coherence Microscopy.” *Journal of Biomedical Optics* 16 (11): 116012. doi:10.1117/1.3650770.
- Benveniste, H., K. Kim, L. Zhang, and G. A. Johnson. 2000. “Magnetic Resonance Microscopy of the C57BL Mouse Brain.” *NeuroImage* 11 (6 Pt 1): 601–11. doi:10.1006/nimg.2000.0567.
- Bowen, Chris V., Joseph S. Gati, and Ravi S. Menon. 2006. “Robust Prescan Calibration for Multiple Spin-Echo Sequences: Application to FSE and B-SSFP.” *Magnetic Resonance Imaging* 24 (7): 857–67. doi:10.1016/j.mri.2006.04.008.
- Dodt, Hans-Ulrich, Ulrich Leischner, Anja Schierloh, Nina Jährling, Christoph Peter Mauch, Katrin Deininger, Jan Michael Deussing, Matthias Eder, Walter Zieglgänsberger, and Klaus Becker. 2007. “Ultramicroscopy: Three-Dimensional Visualization of Neuronal Networks in the Whole Mouse Brain.” *Nature Methods* 4 (4): 331–36. doi:10.1038/nmeth1036.
- Double, K. L., G. M. Halliday, J. J. Kril, J. A. Harasty, K. Cullen, W. S. Brooks, H. Creasey, and G. A. Broe. 1996. “Topography of Brain Atrophy during Normal Aging and Alzheimer’s Disease.” *Neurobiology of Aging* 17 (4): 513–21.
- Fu, Yan, T. B. Huff, Han-Wei Wang, Ji-Xin Cheng, and Haifeng Wang. 2008. “Ex Vivo and *in Vivo* Imaging of Myelin Fibers in Mouse Brain by Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy.” *Optics Express* 16 (24): 19396. doi:10.1364/OE.16.019396.
- Hohmann, Martin, B. Lengenfelder, R. Kanawade, F. Klämpfl, and Michael Schmidt. 2015. “Extension of Depth-Resolved Reconstruction of Attenuation Coefficients in Optical Coherence Tomography for Slim Samples.” In , edited by Takashige Omatsu, Yoshio Hayasaki, Yusuke Ogura, Yasuyuki Ozeki, and Seigo Ohno, 97920P. doi:10.1117/12.2205030.
- Jeon, Sung W., Mark A. Shure, Ken B. Baker, David Huang, Andrew M. Rollins, Ali Chahlavi, and Ali R. Rezai. 2006. “A Feasibility Study of Optical Coherence Tomography for

- Guiding Deep Brain Probes.” *Journal of Neuroscience Methods* 154 (1–2): 96–101. doi:10.1016/j.jneumeth.2005.12.008.
- Jiang, Yi, and G. Allan Johnson. 2010. “Microscopic Diffusion Tensor Imaging of the Mouse Brain.” *NeuroImage* 50 (2): 465–71. doi:10.1016/j.neuroimage.2009.12.057.
- Jones, S. E., B. R. Buchbinder, and I. Aharon. 2000. “Three-Dimensional Mapping of Cortical Thickness Using Laplace’s Equation.” *Human Brain Mapping* 11 (1): 12–32.
- Kitamura, Soichiro, Kuniaki Kiuchi, Toshiaki Taoka, Kazumichi Hashimoto, Shotaro Ueda, Fumihiko Yasuno, Masayuki Morikawa, Kimihiko Kichikawa, and Toshifumi Kishimoto. 2013. “Longitudinal White Matter Changes in Alzheimer’s Disease: A Tractography-Based Analysis Study.” *Brain Research* 1515 (June): 12–18.
- Klein, Arno, Jesper Andersson, Babak A. Ardekani, John Ashburner, Brian Avants, Ming-Chang Chiang, Gary E. Christensen, et al. 2009. “Evaluation of 14 Nonlinear Deformation Algorithms Applied to Human Brain MRI Registration.” *NeuroImage* 46 (3): 786–802. doi:10.1016/j.neuroimage.2008.12.037.
- Kremer, A., S. Lippens, S. Bartunkova, B. Asselbergh, C. Blanpain, M. Fendrych, A. Goossens, et al. 2015. “Developing 3D SEM in a Broad Biological Context.” *Journal of Microscopy* 259 (2): 80–96. doi:10.1111/jmi.12211.
- Kuan, Leonard, Yang Li, Chris Lau, David Feng, Amy Bernard, Susan M. Sunkin, Hongkui Zeng, Chinh Dang, Michael Hawrylycz, and Lydia Ng. 2015. “Neuroinformatics of the Allen Mouse Brain Connectivity Atlas.” *Methods* 73 (February): 4–17. doi:10.1016/j.ymeth.2014.12.013.
- Kwon, J. S., R. W. McCarley, Y. Hirayasu, J. E. Anderson, I. A. Fischer, R. Kikinis, F. A. Jolesz, and M. E. Shenton. 1999. “Left Planum Temporale Volume Reduction in Schizophrenia.” *Archives of General Psychiatry* 56 (2): 142–48.
- Leahy, Conor, Harsha Radhakrishnan, and Vivek J. Srinivasan. 2013. “Volumetric Imaging and Quantification of Cytoarchitecture and Myeloarchitecture with Intrinsic Scattering Contrast.” *Biomedical Optics Express* 4 (10): 1978. doi:10.1364/BOE.4.001978.

- Lefebvre, Joël, Alexandre Castonguay, and Frédéric Lesage. 2017. “White Matter Segmentation by Estimating Tissue Optical Attenuation from Volumetric OCT Massive Histology of Whole Rodent Brains.” In , edited by Thomas G. Brown, Carol J. Cogswell, and Tony Wilson, 1007012. doi:10.1117/12.2251173.
- Li, A., H. Gong, B. Zhang, Q. Wang, C. Yan, J. Wu, Q. Liu, S. Zeng, and Q. Luo. 2010. “Micro-Optical Sectioning Tomography to Obtain a High-Resolution Atlas of the Mouse Brain.” *Science* 330 (6009): 1404–8. doi:10.1126/science.1191776.
- Márquez-Neila, Pablo, Luis Baumela, and Luis Alvarez. 2014. “A Morphological Approach to Curvature-Based Evolution of Curves and Surfaces.” *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 36 (1): 2–17. doi:10.1109/TPAMI.2013.106.
- Miller, Karla L., Charlotte J. Stagg, Gwenaëlle Douaud, Saad Jbabdi, Stephen M. Smith, Timothy E. J. Behrens, Mark Jenkinson, et al. 2011. “Diffusion Imaging of Whole, Post-Mortem Human Brains on a Clinical MRI Scanner.” *NeuroImage* 57 (1): 167–81. doi:10.1016/j.neuroimage.2011.03.070.
- Miyata, Jun, Kazuyuki Hirao, Chihiro Namiki, Hidenao Fukuyama, Tsutomu Okada, Yukio Miki, Takuji Hayashi, and Toshiya Murai. 2007. “Interfrontal Commissural Abnormality in Schizophrenia: Tractography-Assisted Callosal Parcellation.” *Schizophrenia Research* 97 (1-3): 236–41.
- Nair, Aarti, Jeffrey M. Treiber, Dinesh K. Shukla, Patricia Shih, and Ralph-Axel Müller. 2013. “Impaired Thalamocortical Connectivity in Autism Spectrum Disorder: A Study of Functional and Anatomical Connectivity.” *Brain: A Journal of Neurology* 136 (Pt 6): 1942–55.
- Oh, Seung Wook, Julie A. Harris, Lydia Ng, Brent Winslow, Nicholas Cain, Stefan Mihalas, Quanxin Wang, et al. 2014. “A Mesoscale Connectome of the Mouse Brain.” *Nature* 508 (7495): 207–14. doi:10.1038/nature13186.
- Otsu, Nobuyuki. 1979. “A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms.” *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics* 9 (1): 62–66. doi:10.1109/TSMC.1979.4310076.

- Price, Diana L., Sunny K. Chow, Natalie A. B. Maclean, Hiroyuki Hakozaiki, Steve Peltier, Maryann E. Martone, and Mark H. Ellisman. 2006. "High-Resolution Large-Scale Mosaic Imaging Using Multiphoton Microscopy to Characterize Transgenic Mouse Models of Human Neurological Disorders." *Neuroinformatics* 4 (1): 65–80. doi:10.1385/NI:4:1:65.
- Quester, Ralf, and Roland Schröder. 1997. "The Shrinkage of the Human Brain Stem during Formalin Fixation and Embedding in Paraffin." *Journal of Neuroscience Methods* 75 (1): 81–89. doi:10.1016/S0165-0270(97)00050-2.
- Ragan, Timothy, Lolahon R Kadiri, Kannan Umadevi Venkataraju, Karsten Bahlmann, Jason Sutin, Julian Taranda, Ignacio Arganda-Carreras, Yongsoo Kim, H Sebastian Seung, and Pavel Osten. 2012. "Serial Two-Photon Tomography for Automated Ex Vivo Mouse Brain Imaging." *Nature Methods* 9 (3): 255–58. doi:10.1038/nmeth.1854.
- Rohlfing, Torsten, Robert Brandt, Randolph Menzel, and Calvin R. Maurer. 2004. "Evaluation of Atlas Selection Strategies for Atlas-Based Image Segmentation with Application to Confocal Microscopy Images of Bee Brains." *NeuroImage* 21 (4): 1428–42. doi:10.1016/j.neuroimage.2003.11.010.
- Schmitt, Andrea, Alkomiet Hasan, Oliver Gruber, and Peter Falkai. 2011. "Schizophrenia as a Disorder of Disconnectivity." *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 261 Suppl 2 (November): S150–54.
- Schwarz, Martin K., Annemarie Scherbarth, Rolf Sprengel, Johann Engelhardt, Patrick Theer, and Guenter Giese. 2015. "Fluorescent-Protein Stabilization and High-Resolution Imaging of Cleared, Intact Mouse Brains." Edited by William H. Merigan. *PLOS ONE* 10 (5): e0124650. doi:10.1371/journal.pone.0124650.
- Tomer, Raju, Li Ye, Brian Hsueh, and Karl Deisseroth. 2014. "Advanced CLARITY for Rapid and High-Resolution Imaging of Intact Tissues." *Nature Protocols* 9 (7): 1682–97. doi:10.1038/nprot.2014.123.
- Tustison, Nicholas J., Brian B. Avants, Philip A. Cook, Yuanjie Zheng, Alexander Egan, Paul A. Yushkevich, and James C. Gee. 2010. "N4ITK: Improved N3 Bias Correction." *IEEE Transactions on Medical Imaging* 29 (6): 1310–20. doi:10.1109/TMI.2010.2046908.

- Vermeer, K. A., J. Mo, J. J. A. Weda, H. G. Lemij, and J. F. de Boer. 2014. "Depth-Resolved Model-Based Reconstruction of Attenuation Coefficients in Optical Coherence Tomography." *Biomedical Optics Express* 5 (1): 322. doi:10.1364/BOE.5.000322.
- Walt, Stéfan van der, Johannes L. Schönberger, Juan Nunez-Iglesias, François Boulogne, Joshua D. Warner, Neil Yager, Emmanuelle Gouillart, Tony Yu, and scikit-image contributors. 2014. "Scikit-Image: Image Processing in Python." *PeerJ* 2: e453. doi:10.7717/peerj.453.
- Wang, Hui, Adam J. Black, Junfeng Zhu, Tyler W. Stigen, Muhammad K. Al-Qaisi, Theoden I. Netoff, Aviva Abosch, and Taner Akkin. 2011. "Reconstructing Micrometer-Scale Fiber Pathways in the Brain: Multi-Contrast Optical Coherence Tomography Based Tractography." *NeuroImage* 58 (4): 984–92. doi:10.1016/j.neuroimage.2011.07.005.
- Wang, Hui, Christophe Lenglet, and Taner Akkin. 2015. "Structure Tensor Analysis of Serial Optical Coherence Scanner Images for Mapping Fiber Orientations and Tractography in the Brain." *Journal of Biomedical Optics* 20 (3): 36003. doi:10.1117/1.JBO.20.3.036003.
- Wang, Hui, Junfeng Zhu, and Taner Akkin. 2014. "Serial Optical Coherence Scanner for Large-Scale Brain Imaging at Microscopic Resolution." *NeuroImage* 84 (January): 1007–17. doi:10.1016/j.neuroimage.2013.09.063.
- Wang, Hui, Junfeng Zhu, Martin Reuter, Louis N. Vinke, Anastasia Yendiki, David A. Boas, Bruce Fischl, and Taner Akkin. 2014. "Cross-Validation of Serial Optical Coherence Scanning and Diffusion Tensor Imaging: A Study on Neural Fiber Maps in Human Medulla Oblongata." *NeuroImage* 100 (October): 395–404. doi:10.1016/j.neuroimage.2014.06.032.
- Wang, Kun, Meng Liang, Liang Wang, Lixia Tian, Xinqing Zhang, Kuncheng Li, and Tianzi Jiang. 2007. "Altered Functional Connectivity in Early Alzheimer's Disease: A Resting-State fMRI Study." *Human Brain Mapping* 28 (10): 967–78.
- Wehrl, Hans F., Ilja Bezrukov, Stefan Wiehr, Mareike Lehnhoff, Kerstin Fuchs, Julia G. Mannheim, Leticia Quintanilla-Martinez, et al. 2015. "Assessment of Murine Brain Tissue Shrinkage Caused by Different Histological Fixatives Using Magnetic Resonance and Computed Tomography Imaging." *Histology and Histopathology* 30 (5): 601–13.

- Weisbecker, Vera. 2012. "Distortion in Formalin-Fixed Brains: Using Geometric Morphometrics to Quantify the Worst-Case Scenario in Mice." *Brain Structure and Function* 217 (2): 677–85. doi:10.1007/s00429-011-0366-1.
- Wu, Dan, Jiadi Xu, Michael T. McMahon, Peter C.M. van Zijl, Susumu Mori, Frances J. Northington, and Jiangyang Zhang. 2013. "In Vivo High-Resolution Diffusion Tensor Imaging of the Mouse Brain." *NeuroImage* 83 (December): 18–26. doi:10.1016/j.neuroimage.2013.06.012.

## 4.7 Supplementary figure

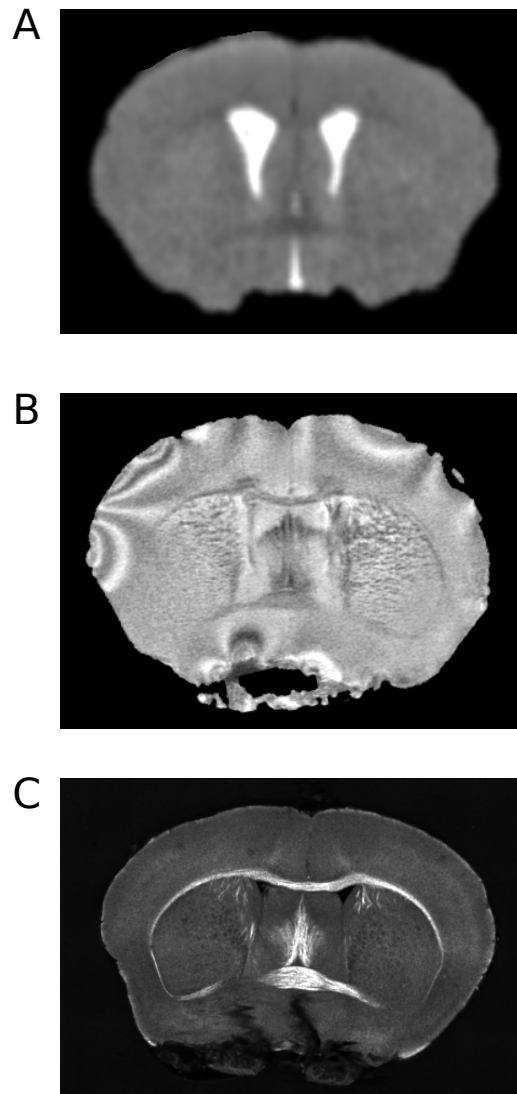


Figure 4.7 : Coronal sections of an individual brain acquired with *in vivo* MRI (A), *ex vivo* MRI (B) and slicer imaging (C). TFISP sequence generates strong banding artifacts in *ex vivo* MRI (B). Note the collapsed ventricles in *ex vivo* imaging (B-C) compared to *in vivo* MRI imaging (A). In slicer imaging, water filled ventricles appear dark whereas they appear bright in *in vivo* due to high signal generated in cerebrospinal fluid. Coronal sections were taking at the same antero-posterior coordinates.

## CHAPITRE 5     ARTICLE 2 : SERIAL OPTICAL COHERENCE SCANNING REVEALS AN ASSOCIATION BETWEEN CARDIAC FUNCTION AND THE HEART ARCHITECTURE IN THE AGING RODENT HEART

Ce second article réfère au troisième objectif présenté dans cette thèse. Le but ici était d'utiliser le système développé pour faire une étude de groupe, où l'on détecte des changements microscopiques à l'échelle d'un organe en entier. Ainsi, le système a permis d'étudier l'impact du vieillissement sur le cœur de la souris. Pour ce faire, les cœurs de souris jeunes et âgées ont été imagés avec la plateforme d'imagerie, révélant l'architecture des fibres du myocarde de la souris. Préalablement, les animaux ont été imagés *in vivo* à l'IRM pour ainsi corréler les changements structurels mesurés à une modification de la fonction cardiaque. Cet article a été soumis à la revue *Biomedical Optics Express* le 8 août 2017.

*Authors* : Alexandre Castonguay<sup>1,\*</sup>, Joël Lefebvre<sup>1</sup>, Philippe Pouliot<sup>1,2</sup>, Pramod Avti<sup>3</sup>, Mohammad Moeini<sup>1,2</sup>, Frédéric Lesage<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>École Polytechnique de Montréal, C.P. 6079, Succ. Centre-ville, Montréal QC, Canada H3C3A7

<sup>2</sup>Institut de Cardiologie de Montréal, 5000 rue Bélanger Est, Montréal, QC, Canada H1T1C8

<sup>3</sup>Department of Biophysics, Postgraduate Institute of Medical Education and Research, Chandigarh, India – 160012

\*alexandrecastonguay87@gmail.com

*Abstract* : Normal aging is accompanied by structural changes in the heart architecture. To explore this remodeling, we used a serial optical coherence tomography scanner to image entire mouse hearts at micron scale resolution. *Ex vivo* hearts of 7 young (4 months) and 5 old (24 months) C57BL/6 mice were acquired with the imaging platform. OCT of the myocardium revealed myofiber orientation changing linearly from the endocardium to the epicardium. In old mice, this rate of change was lower when compared to young mice while the average volume of



old mice hearts was significantly larger ( $p < 0.05$ ). Myocardial wall thickening was also accompanied by extracellular spacing in the endocardium, resulting in a lower OCT attenuation coefficient in old mice endocardium ( $p < 0.05$ ). Prior to serial sectioning, cardiac function of the same hearts was imaged *in vivo* using MRI and revealed a reduced ejection fraction with aging. The use of a serial optical coherence tomography scanner allows new insight into fine age-related changes of the heart associated with changes in heart function.

**Keywords :** Tissue characterization, Optical coherence tomography, Three-dimensional microscopy, Functional monitoring and imaging

## 5.1 Introduction

The incidence and prevalence of cardiovascular diseases increase with aging (Lakatta 2003a). Normal aging of the heart is associated with changes in its architectural morphology (Lakatta 2003b). Furthermore, left ventricular (LV) hypertrophy is associated with increasing age, which is known to increase the risk of stroke and cardiovascular disease in (Levy et al. 1990; Haider et al. 1998). During aging, the mechanical function of the heart is also affected (Schulman et al. 1992; Swinne et al. 1992). Among potential transducers of these changes, the organization of myocardial fibers plays a key role in mechanical and electrical function (D. D. Streeter et al. 1969; Taccardi et al. 1994). Histology has revealed a cross-helical structure in the heart muscle, whereas myofibers in the epicardium form a left-handed helix and myofibers in the endocardium form a right-handed helix (D. D. Streeter and Hanna 1973). Myofiber disorganization jeopardizes normal heart function and is known to result in cardiovascular disorders such as myocardial infarction (Strijkers et al. 2009)

Histology has widely been used to investigate the heart morphology at the cellular level (Brooks et al. 2003; D. D. Streeter et al. 1969; D. D. Streeter and Hanna 1973; LeGrice et al. 1995; Daniel D. Streeter and Bassett 1966). However, histological studies only provide a small representation of the entire heart and do not access microstructural organization in the intact organ. Magnetic resonance imaging (MRI) has emerged as a tool to image the intact heart both *ex vivo* (Scollan et al. 1998) and *in vivo* (Reese et al. 1995). Diffusion tensor MRI (DTI) allows for 3D characterization of the myocardium structure (Sosnovik et al. 2009, 2014; W. Li et al. 2009).

However, DTI imaging has a limited spatial resolution (typically not better than  $50\mu\text{m}$ ), which is not sufficient to reveal the heart microstructure in details, especially when studying mouse models which are widely used in cardiovascular research.

High resolution optical coherence tomography (OCT) has emerged as a proficient tool to image cardiac tissue (Goergen et al. 2012; Fleming et al. 2008). OCT imaging is based on backscattered signal from tissue to obtain depth-resolved information and does not rely on exogenous contrast agents. The high spatial resolution of OCT, typically of the order of a few micrometers, allows visualization of microstructural details of heart muscle fibers. Native OCT contrast has been used to characterize myocardial fiber orientation using *en face* 2D planes in the mouse heart (Goergen et al. 2016; Ambrosi et al. 2012). Others have used polarization-sensitive OCT systems to measure local retardance and thus obtain fiber orientation along the optical axis (Fan and Yao 2013; Yuanbo Wang and Yao 2013; Y. Wang et al. 2014). However, limited light penetration in biological tissue and the small imaging field of view allowed by microscopic imaging limits our ability to image the entire heart. Thus, obtaining a highly resolved OCT dataset of the entire mouse heart remains challenging.

To overcome this challenge, we recently developed a motorized serial OCT scanner to sequentially slice through agarose embedded tissue (Lefebvre et al. 2017). Serial histology imaging scanners have been demonstrated in recent years (Amato et al. 2016; Ragan et al. 2012) as a technique able to image entire small organs at microscopic resolution and have been combined to many imaging modalities including OCT (H. Wang, Zhu, and Akkin 2014; H. Wang et al. 2011). This system allows block-face imaging of large sections of exposed intact tissue, before removing a thin slice with a vibratome, exposing new tissue to image. Each slice is serially scanned to image every sub-region of a large surface. Post-processing algorithms are then used to reconstruct a 3D dataset of the entire small animal organ.

With this system, we can image entire mouse hearts with little human intervention and in a time-lapse of only a few hours, thus allowing group-wise studies. The aim of this study was to use the developed OCT serial scanner to investigate morphological changes in the heart architecture that occur with normal aging. We show that the heart volume increases with age due to the thickening of the left ventricle wall. 2D orientation distribution function (ODF) estimation was also performed in the entire mouse heart, providing estimates of the myofiber transverse angle.

Results show that the slope of fiber orientation versus wall depth changes with age. In the same animals, and prior to serial sectioning, *in vivo* MRI imaging of the heart revealed a reduced ejection fraction with aging, suggesting that changes in heart architecture are linked to heart efficiency.

## 5.2 Methods

The Animal Research Ethics Committee of the Montreal Heart Institute approved all procedures, in accordance with the Canadian Council on Animal Care recommendations. A total of 12 mice (C57B16) were used in this study categorized into 2 groups: young mice (4 months old, n=7) and aged mice (24 months old, n=5).

### 5.2.1 MRI cardiac imaging

Cardiac CINE MRI was performed on a 30 cm 7T horizontal MR scanner (Agilent, Palo Alto, CA) with mice in prone position, with a 12 cm inner diameter gradient coil insert (gradient strength 600 mT/m, rise-time 130  $\mu$ s). A 4-channel receive only surface coil positioned under the mouse was used in combination with a quadrature transmit/receive birdcage coil with an internal diameter of 69 mm (RAPID Biomedical, Germany). Anesthesia was maintained with 2.0-2.5% isoflurane in pure oxygen and body temperature was maintained at 37.0°C using a warm air fan (SA Instruments, Stony Brook, NY). ECG was recorded via two metallic needles placed subcutaneously near the heart under the armpits. A pressure transducer for respiratory gating was placed under the abdomen near the sternum. The animal was then positioned into the MRI and a combination of manual and automatic shimming was used to shim over the heart region. Scout images were obtained for choosing heart short axis slices. A CINE sequence was run with simultaneous ECG triggering and respiration gating (double gating), while maintaining the steady-state (Cassidy et al. 2004; Schneider et al. 2003), with effective TR equal to the RR-interval, TE = 1.4 ms, 16 cardiac time frames, FOV 30x30 mm, matrix size 192x192, slice thickness 0.8 mm, no gap, flip angle 20 degrees, 8 averages, 147 kHz acquisition bandwidth, 10 short axis slices covering the whole left ventricle, for an acquisition time of 33 minutes.

### 5.2.2 Ex vivo tissue preparation

Animals were anesthetized under 2% isoflurane and transcardially perfused through the apex of the heart with 20 mL of saline, followed by 20 mL of 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffer saline (PBS) at a rate of 2 mL/min. The heart was carefully extracted and submerged in 4% PFA. Each mouse heart was suspended upside down, with the apex facing up, in a 4% oxidized agarose block (Ragan et al. 2012) using a custom holder before serial imaging.

### 5.2.3 Serial OCT imaging

A custom build automated serial histology scanner combined with swept-source optical coherence tomography (SS-OCT) microscope was used to image the agarose embedded mouse hearts. The developed SS-OCT setup was reported in previous work (Castonguay et al. 2015; Lesage et al. 2015; Tardif et al. 2016; Lefebvre et al. 2017). Briefly, a vibratome is used to sequentially slice through the agarose embedded samples to expose new tissue to image (Figure 5.1.A). Linear stage motors are used to move the sample relative to the objective to image every sub-region of the exposed tissue plane. After imaging each section, a vertical stage raises the sample to remove a 200 $\mu$ m thick slice of already imaged tissue. The vertical position is adjusted to have the focus of the objective at 100  $\mu$ m under the tissue surface, thus imaging intact tissue.

The OCT microscope uses a fibered swept-source laser ( $\lambda = 1310 \pm 100$  nm) with a 50kHz sweep rate (Axsun, 1310 Swept Source Engine) to capture OCT volumetric datasets of 512 B-scans with 512 A-lines each in around 5 seconds. The beam exiting the fiber is enlarged with a telescope ( $f_1 = 35$  mm,  $f_2 = 100$  mm) to fill the pupil of a 3x telecentric objective (Thorlabs, LSM04), which is used to scan the surface of the tissue using a pair of galvanometric mirrors. This low magnification objective allowed to image large field of views (2.5 x 2.5) mm with a measured lateral resolution of 8 $\mu$ m in water. A custom-made coverslip was used to transition from air surrounding the microscope objective to water surrounding the submerged sample, to preserve the same water thickness in each image and to avoid water ripples. Refractive index matched glass was used in the reference arm to compensate dispersion in optical components and allowed

to have an axial resolution of  $10\mu\text{m}$  in water. To save hard drive space, highly attenuated and out of focus volumetric data at a depth over  $780\mu\text{m}$  was discarded.

Post-processing algorithms were developed to reconstruct 3D OCT volumetric datasets. Briefly, the computation of the phase-correlation of all neighboring tiles within a mosaic plane allowed to estimate the position of every imaged sub-region. Next, linear blending of overlapping tiles was used to stitch together all volumes for each slice. Finally, slices were stitched together along the axial direction by computing the shift between adjacent slices using the cross-correlation of the 2D image gradient and were fused using linear blending. The reconstruction gave rise to a 3D dataset of optical reflectivity in heart tissue. The axial PSF was extracted from the data and used to compensate for the objective's signal variation along the depth axis. To compensate attenuation in biological tissue, the depth dependent signal intensity attenuation due to light scattering and absorption was also corrected using a single scattering photon model to estimate local attenuation coefficient (Vermeer et al. 2014; Hohmann et al. 2015). Details regarding the OCT data reconstruction and attenuation compensation can be found in (Lefebvre et al. 2017).

#### **5.2.4 MRI data analysis**

Ejection fraction (EF) and left ventricle mass were estimated by manually segmenting the left ventricle in MRI images using the software Segment (Medviso, Lund University (Heiberg et al. 2010)). Papillary muscles and the apex slice were excluded from the segmentations. The average heart rate (HR) during the cardiac CINE scan was calculated retrospectively from the physiological data, allowing an estimate of the cardiac output (CO).

#### **5.2.5 OCT data analysis**

OCT datasets were collected from 12 mice and fiber orientation within the entire left ventricle was of interest. For 2D orientation estimations, we took an average intensity projection (AIP) over  $200\mu\text{m}$  around the focus for each tissue slice to enhance the myofiber structure. As described in (Goergen et al. 2012), a 2D discrete Fourier transform (DFT) over areas of  $(200 \times 200)\mu\text{m}$  was calculated after multiplication by a symmetric Hanning window. The local

orientation distribution function (ODF) was obtained by summing the high-pass filtered 2D DFT slice magnitude squared at each angle:

$$ODF(\theta) = \int_{-\infty}^{\infty} |F_w(f_x, f_y)|^2 H(f_x, f_y) df \quad (5.1)$$

where  $f_x$  is  $-f \sin \theta$ ,  $f_y$  is  $f \cos \theta$ ,  $F_w$  is the windowed Fourier transform and  $H$  is a high-pass filter. The maximum of the ODF indicates the dominant fiber orientation, which was, by definition, between  $-90^\circ$  and  $90^\circ$ . ODFs were measured over entire slices by steps of  $25\mu\text{m}$  to obtained large scale 2D orientation maps. To express fiber orientation in polar coordinates, we defined the origin relative to the epicardial surface of the heart. Fiber orientation values are thus expressed in terms of the radial position relative to the center of the slice.

To measure the heart volume, previously constructed AIPs over  $200\mu\text{m}$  for each slice were masked. First, the 2D AIPs edges were enhanced by subtracting a morphological dilation of the original image to its morphological erosion. Dilation and erosion were generated using a disk of radius  $25\mu\text{m}$ . The resulting edge enhanced image was segmented in two classes using the watershed algorithm such as: pixels with value lower than 5% of the maximum were marked as (1) and pixels with value above the threshold value based on Otsu's method (Otsu 1979) were marked as (2). The resulting heart muscle mask excludes the lumen of the ventricles. Considering a resolution of  $(4.88 \times 4.88 \times 200)\mu\text{m}$  for AIPs, we can measure the slice volume by counting pixels within the heart mask.

## 5.3 Results

### 5.3.1 Serial OCT images

Following embedding, hearts could be automatically imaged consistently on the serial OCT scanner and reconstructed with high quality (Figure 5.1). 3D volumes were then used to yield either short or long axis views with no noticeable artefacts. The imaging platform could image the entire ventricles of the heart, revealing a higher contrast in the midwall of the left ventricle.

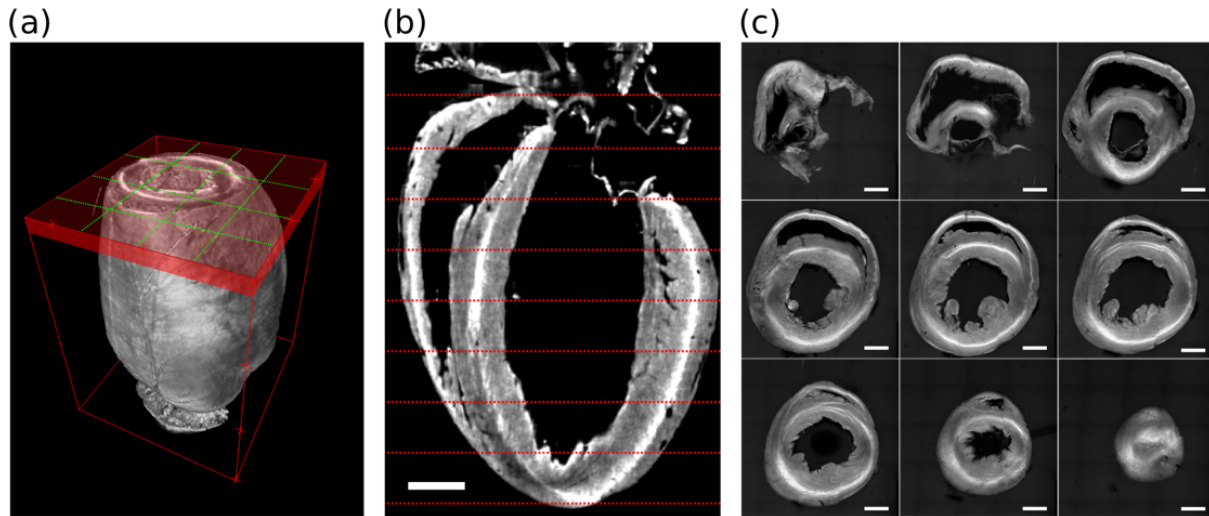


Figure 5.1 : Heart reconstruction from serial OCT imaging. A : Schematic of the heart positioning for serial sectioning. Red borders delimit the volume acquired by the system. Red area shows volumetric data imaged by one serially scanned section with green lines delimiting adjacent tiles imaged by the microscope. B : Long axis view of the heart showing left and right ventricles. Red lines show position of short axis views in C. C : short axis views spaced by one millimeter. Scale bar: 1mm.

When focusing on average intensity projections over short axis slices (Figure 5.2.B), the structure of myocardial fibers was clearly identified and enabled ODF estimation on a pixel by pixel basis. Focusing on small regions, one can identify the orientation of myocardial fibers (Figure 5.2.C.i-iii). Estimations based on the ODFs were used to generate maps of transverse orientation across the whole slice. ODFs over entire short axis views revealed the particular organization in myocardial fibers, whereas fibers in the epicardium show a left-handed organization and fibers in the endocardium a right-handed orientation. Note that Figure 5.2 shows short axis slices as viewed from the apex, inverting the left/right handed organization of endo/epicardium. Color coding the fiber orientation gave rise to swirl-like images of the short axis views over the whole heart (Figure 5.2.D-E). Converting fiber orientation to polar coordinates relative to the center of the short axis slices shows a varying fiber orientation with wall depth (Figure 5.2.F). Polar angle was inverted to respect fiber orientation convention, where short axis is viewed from the base. The polar coordinate system allowed measurement of relative fiber orientation with wall depth (Figure 5.2.G) and wall thickness relative to angular position (Figure 5.2.H). The center of each short axis slices was determined from the tissue mask by consecutive morphological erosions until a single pixel remained.

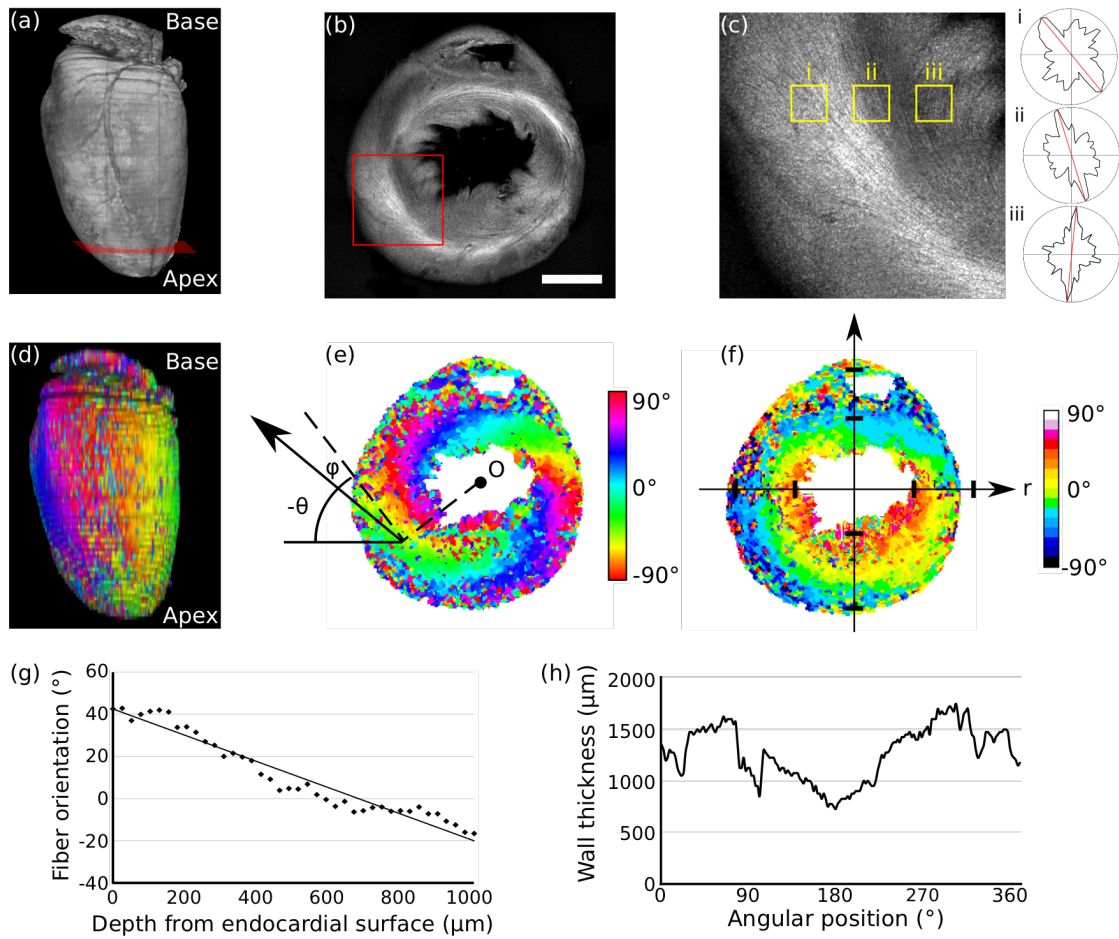


Figure 5.2 : Myofiber architecture. A : 3D representation of a young mouse heart. B : short axis AIP over 200μm around red plane depicted in A. Scale bar: 1mm. C : Detailed view of region presented in B with ODFs showing preferred orientation in region of interest of (200 x 200) μm. D : 3D in plane orientation of heart shown in A. E : In plane orientation of short axis view in B. Arrow shows local fiber oriented at an angle described in Cartesian coordinates ( $\theta$ ) and in polar coordinates ( $\varphi$ ) relative to the center  $O$  of the slice. F : Fiber orientation converted to polar coordinates, relative to the center of the slice.  $r$ : distance to the center. G : Average fiber orientation along depth from endocardial surface for the slice presented in F. Fitted line to the measured data shows an orientation change of  $0.07^\circ/\mu\text{m}$ . H : Left ventricle wall thickness as a function of the radial position of slice in (f).

### 5.3.2 Age dependent changes in myocardial fiber organization

Consolidating data across all hearts, we investigated age-related changes in left ventricle volume and rate of orientation change as a function of radial distance (Figure 5.3). Transverse fiber orientation changes were higher near the apex of the heart and decreased at 4mm from the apex. The fiber orientation changes at a given distance from the apex were measured over the entire



short axis plane. Left ventricle wall thickness averaged at 1.1mm close to the apex and rose to 1.5 mm at 4mm from the apex for both age groups (Figure 5.3.B). As expected, we measured a significant change ( $p<0.05$ ) in ventricle volume, increasing with age (Figure 5.3.D). The change in ventricular volume, more specifically a thickening the ventricle wall, was more apparent at 1-2mm from the apex. Expansion of ventricle volume was accompanied by a reorganization of the myocardial fibers along their angular direction with reduced orientation change as a function of distance (Figure 5.3.A). A paired  $t$ -test showed that there was a significant difference in orientation change for matched distances from the apex ( $p<0.01$ ). Looking at the total change in orientation, we observed that the average angle at the endocardial surface (4 months:  $38.4 \pm 0.8^\circ$  / 24 months:  $38.2 \pm 0.3^\circ$ ) and at the epicardial surface (4 months:  $-32.3 \pm 0.4^\circ$  / 24 months:  $-31.6 \pm 0.3^\circ$ ) remained similar for both age groups.

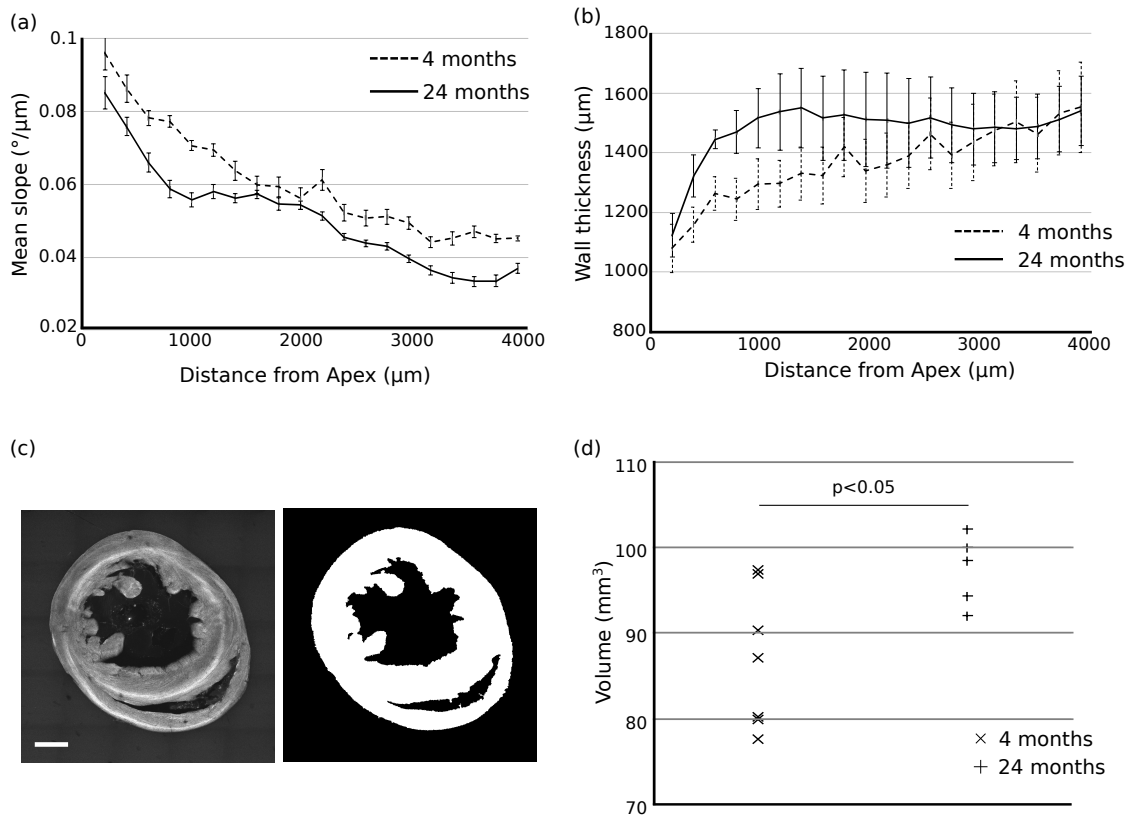


Figure 5.3 : Age dependent changes in heart architecture. A : Average myofiber orientation changes as a function of distance from apex for young and aged mice. A paired  $t$ -test showed a significant ( $p<0.01$ ) orientation difference between young and old mice. B : Average left ventricle wall thickness as a function of distance from the apex for young and old mice. C : Tissue masking of a short axis view. D : Heart volume up to 4mm from the apex measured from masked AIPs. A significant heart volume increase was observed in old mice ( $p<0.05$ ). Error bar in (A) and (B) show standard error.

Visual qualitative inspections of short axis views reveal extracellular space within the endocardium of old mice (Figure 5.4.A, green arrows). These extracellular spaces exhibit a low OCT reflectivity contrast, akin to the signal contrast within the ventricle cavity. To further quantify this change, we measured tissue OCT attenuation slopes within specific regions of interest of the endocardium (Figure 5.4.B). For attenuation coefficient measurements, datasets did not undergo the correction for single scattering photon model. When comparing all 12 mice, we observed a significant difference ( $p<0.05$ ) between young and old hearts (Figure 5.4.C) the latter being less attenuating (4 months:  $18.6 \pm 1.3 \text{ cm}^{-1}$  / 24 months :  $15.4 \pm 0.9 \text{ cm}^{-1}$ ).

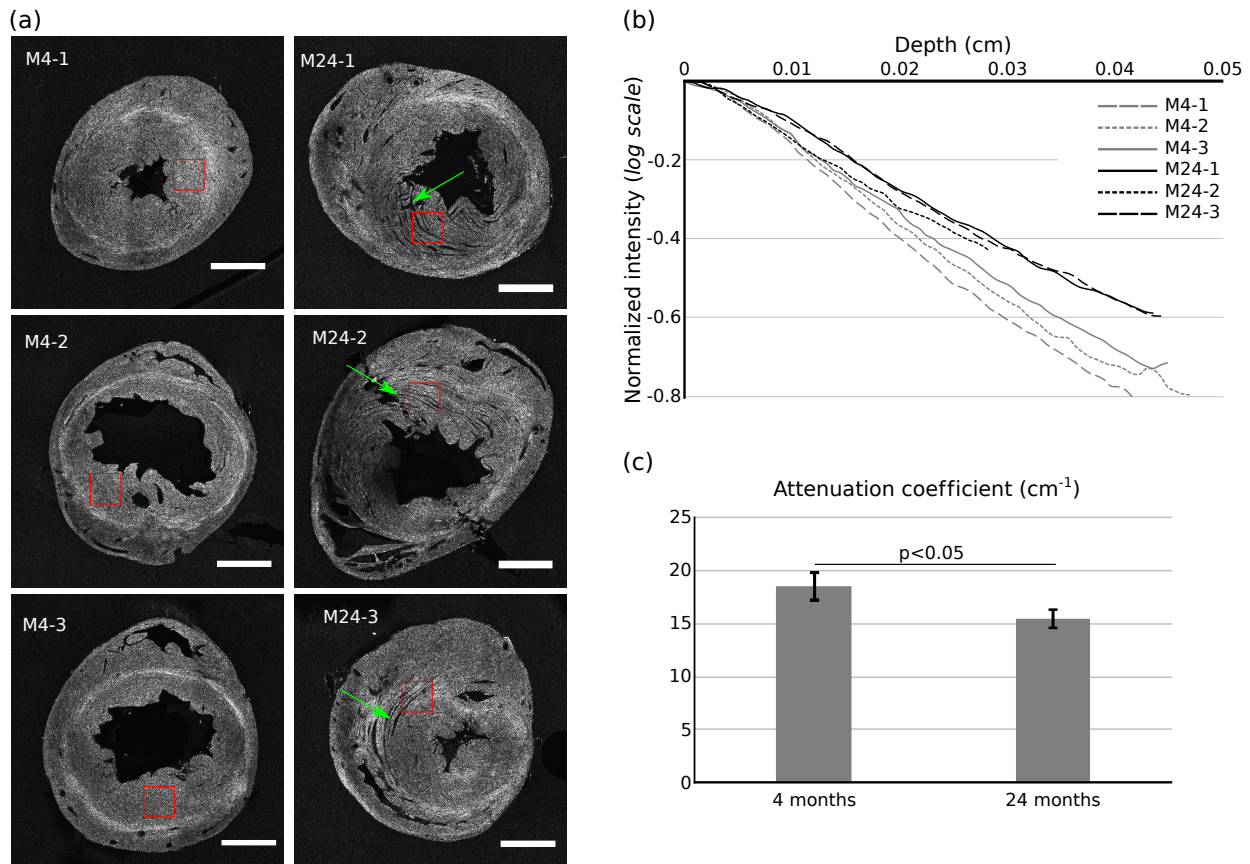


Figure 5.4 : Light attenuation. A : Short axis views taken at 1mm from apex from three young mice (left) and three old mice (right). Red boxes of  $(500 \times 500) \mu\text{m}$  were used to evaluate tissue attenuation. Scale bar: 1mm. B : Tissue attenuation from regions of interest in B. Grey lines: 4 months mice. Black lines: 24 months mice. C : When looking at all mice, light attenuation in endocardium showed a significant decrease ( $p<0.05$ ) in old mice.

The next question was whether this change in myocardial fiber structure would lead to changes in heart function or whether it was an adaptation aiming to preserve function in healthy aging mice. CINE MRI data allowed imaging of the heart at different time points to view the whole cycle of the heartbeat. For both mice age groups, the end-systole (ES) and end-diastole (ED) timeframes were identified. Image contrast of heart muscle was sufficient to segment left ventricle cardiac walls for these two timeframes (Figure 5.5.A). Using Segment (Medviso, Lund University), the maximal LV contraction was estimated for every short axis slices. Contraction was defined as the difference in LV area between ES and ED timeframes for matching axial slices divided by the LV-ED area. Left ventricle contraction was maximal near the apex and gradually reduced as moving towards the base of the heart (Figure 5.5.B). Fiber orientation changes depicted in Figure 5.3.A were plotted against LV-slice contraction ratios for matching distances from the apex (Figure 5.5.C). Linear interpolation between *in vivo* LV-slice contraction ratios was used to compensate the sparse sampling. The change in myofiber orientation was linearly correlated to the LV-contraction ratio. Overall, LV contraction was lower for old mice. Using Segment and the average heart rate during acquisition, acquired via ECG recordings, functional parameters were extracted (Table 5.1). Between age groups, the left ventricle end-systole volume difference was significant ( $p<0.05$ ), going down to 13 $\mu$ L for young mice and as much as 19.8 $\mu$ L for old mice. This resulted in an ejection fraction that was 68.2% for young mice and 58.2% for old mice, reaching a significant difference ( $p<0.05$ ). Other parameters, showed no significant changes (Table 5.1).

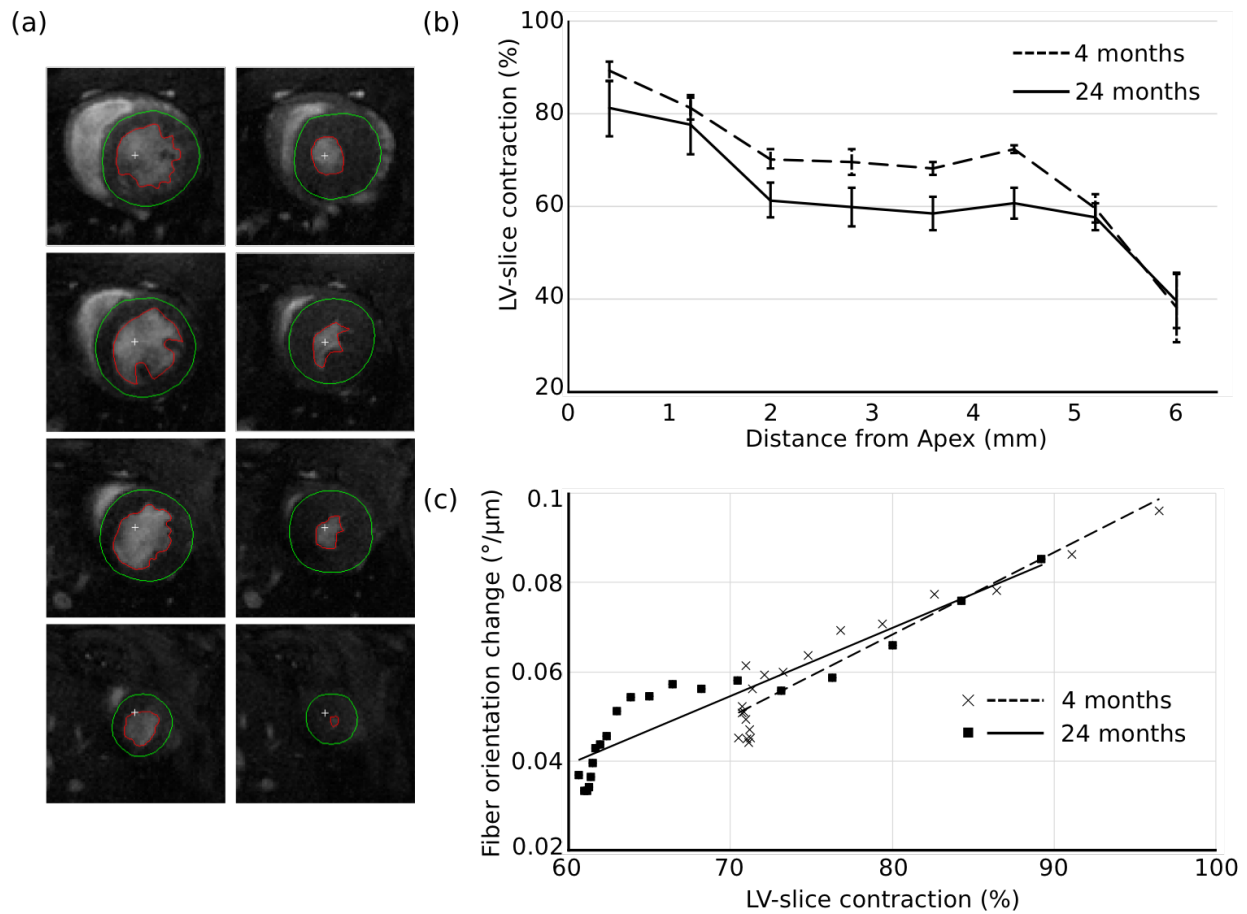


Figure 5.5 : *In vivo* MRI heart imaging. A : Example of end-diastole (left) and end-systole (right) timeframes in a young heart. Each image has a field of view of (10x10) mm and 0.8 mm thick. Green lines delimit epicardial surface and red lines show endocardial surface segmented with Segment software. B : Fraction of left ventricle contraction as a distance from the apex. C : Fiber orientation change plotted against the LV-slice contraction. Dashed line : linear fit to the 4 months group ( $R^2 = 0.885$ ). Full line : linear fit to the 24 months group ( $R^2 = 0.852$ ).

Table 5.1 : Cardiac functional parameters of two aged groups

| Mice ID            | LVM (g) | LV-EDV (ul) | LV-ESV (ul) | LV-SV (ul) | LV-EF (%) | HR (bpm) | CO (ml/min) |
|--------------------|---------|-------------|-------------|------------|-----------|----------|-------------|
| <b>M4-2</b>        | 60      | 43          | 14          | 29         | 67        | 393      | 11.4        |
| <b>M4-2</b>        | 60      | 46          | 15          | 31         | 67        | 479      | 14.8        |
| <b>M4-3</b>        | 78      | 43          | 11          | 32         | 74        | 491      | 15.7        |
| <b>M4-4</b>        | 53      | 42          | 14          | 28         | 67        | 455      | 12.7        |
| <b>M4-5</b>        | 52      | 36          | 12          | 24         | 67        | 583      | 14.0        |
| <b>M4-6</b>        | 53      | 36          | 13          | 23         | 64        | 520      | 12.0        |
| <b>M4-7</b>        | 54      | 41          | 12          | 29         | 71        | 500      | 14.5        |
| <b>M4-Average</b>  | 58.6    | 41.0        | 13.0*       | 28.0       | 68.2*     | 488.7    | 13.6        |
| <b>M24-1</b>       | 59      | 40          | 17          | 23         | 58        | 480      | 11.0        |
| <b>M24-2</b>       | 66      | 47          | 21          | 26         | 55        | 440      | 11.4        |
| <b>M24-3</b>       | 63      | 50          | 18          | 32         | 64        | 499      | 16.0        |
| <b>M24-4</b>       | 60      | 59          | 27          | 32         | 54        | 412      | 13.2        |
| <b>M24-5</b>       | 58      | 39          | 16          | 23         | 59        | 440      | 10.1        |
| <b>M24-Average</b> | 61.2    | 47.0        | 19.8*       | 27.2       | 58.0*     | 454.2    | 12.4        |

LVM : Left Ventricle Mass, LV-EDV : Left Ventricle – End Diastole Volume, LV-ESV : Left Ventricle - End Systole Volume, LV-SV : Left Ventricle - Stroke Volume, LV-EF : Left Ventricle - Ejection Fraction. HR: Heart Rate (beats per minute), CO : Cardiac Output.

\* :  $p < 0.05$ .

## 5.4 Discussion

Serial OCT scanning has proven to be an effective method to image the architecture of the mouse heart. Highly resolved optical reflectivity maps combined with wide range scanning enabled imaging the myocardial fibers of the entire heart at the micrometer scale. The effectiveness of this fully automated technique relies strongly on the ability to obtain repetitive smooth and flat cutting surfaces with the vibratome, which was particularly difficult considering the nature of the heart tissue. First, the empty heart ventricles tend to collapse during vibratome sectioning. Filling the heart ventricles with warm agarose before embedding prevented this issue. Second, the elastic nature of unfrozen blood vessels connected to the heart makes it difficult to obtain a smooth imaging surface. Uncut tissue created shadowing in the focal plane and generated errors when locating the tissue interface. To overcome this inconvenience, the hearts were imaged starting with the apex, whereas the problematic blood vessels were located at the base of the heart. Image quality was thus very much reduced at the base of the heart. Nonetheless, the resulting datasets show highly detailed maps of the left ventricle.

From these datasets, a higher OCT reflectivity appeared in the midwall. This higher contrast could be caused by cross-helical structure of the heart. In the midwall, myofibers are mostly circumferential. Therefore, the incident light was perpendicular to the myofibers at the midwall leading to a higher backscattered signal. Away from the midwall, light was incident at an angle with the myofibers, resulting in a smaller backscattering. ODFs revealed the spiral organization of the myofibers in the left ventricle. A window size of  $(200 \times 200) \mu\text{m}$  was empirically chosen for calculations. The trade-off between resolution and sensitivity determined the optimal window size for ODF calculation. Using smaller windows would have led to less orientation information and resulted in a reduced sensitivity of effective orientation measurement. The use of a higher magnification would have revealed a higher myofiber contrast (Goergen et al. 2012) and would have permitted measuring ODFs at higher resolution with higher sensitivity. However, this is done at the cost of losing some samples due to increased difficulty in acquiring all sub-elements of the image in focus during autonomous slicing.

When comparing young and aged mice, we saw a significant difference in the change of myofiber orientation from the endocardial to the epicardial surface. The average orientation at each cardiac wall remained constant with age, suggesting that the change in orientation was rather caused by the thickening of the LV wall in old mice. *In vivo* measurements showed an increase in LV mass but did not reach a significant statistical difference. A significant difference in LV wall thickness was only observed when measuring at high resolution with serial optical tomography scanning. This observed thickening resulted in a significant increase of ventricular volume, which is well documented in the aging human heart (Levy et al. 1990; Gerstenblith et al. 1977). To determine the nature of the thickening of the LV wall, we measured OCT light attenuation in the endocardium and showed a significant decrease in old mice. Left ventricle thickening could be due to spacing of myofibers, thus explaining the reduction of attenuation. This proposition is supported by our observations of the expansion of interstitial spacing in aged mice and supported by histological analysis of aging hearts by others (W. Li et al. 2009). However, one must temper *ex vivo* measurements of LV wall thickening and volumes. Indeed, perfusion of the heart could occur during systole or diastole, thus impacting the LV wall thickness and limiting conclusions that can be pulled from these measurements.

*In vivo* measurements allowed evaluating the impact of these micro-structural changes on the function of the heart. Cardiac CINE MRI revealed that the left ventricle contraction was more

important near the apex and gradually reduced moving towards the base. These results showed a linear correlation between fiber orientation change and the ability of the left ventricle to contract itself. Regions showing a higher fiber orientation change had an increase ability to contract. Overall, *in vivo* measurements showed that the end-systole volume (ESV) was significantly higher for aged mice. This higher ESV led to a significant reduction of the ejection fraction (EF) with aging. In humans, EF decreases significantly with aging only under exhaustive exercise (Mosterd et al. 1999). Anesthesia used during MRI imaging could cause excessive stress to the mice, mimicking the effort of exercise. Our results suggest that the changes in myofiber architecture are associated with changes in the heart function. One hypothesis, supported by reduced ejection fraction *in vivo*, is that thickening of the LV and the development of fibrotic tissue changes the slope of myofibers which in turn reduces the heart capability to contract along the perpendicular direction for effective blood ejection.

## 5.5 Conclusion

In this study, we used serial optical coherence tomography to image changes in the heart architecture with normal aging in mice. Serial sectioning combines the high resolution achieved with histology and the wide field of view allowed by MRI imaging to give a new tool to investigate subtle changes in the whole heart muscle organization. Our results show that changes in the heart morphology are accompanied with changes in its function, as demonstrated by *in vivo* MRI data analysis. Combining large scale histology to *in vivo* imaging and being able to anatomically register comparable information, we hope to refine the potential of MRI as a diagnostic tool to understand underlying microscopic changes of the heart organization.

### *Fundings*

Fonds de Recherche du Québec – Nature et Technologies (FRQNT) (501100003151) attributed to Alexandre Castonguay and Joël Lefebvre.

Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (501100000038) attributed to Philippe Pouliot and Frédéric Lesage.

Canadian Institutes of Health Research (CIHR) (501100000024) attributed to Frédéric Lesage.

### *Disclosures*

The authors declare that there are no conflicts of interest related to this article.

## **5.6 References**

- Amato, Stephen P., Feng Pan, Joel Schwartz, and Timothy M. Ragan. 2016. “Whole Brain Imaging with Serial Two-Photon Tomography.” *Frontiers in Neuroanatomy* 10 (March). doi:10.3389/fnana.2016.00031.
- Ambrosi, Christina M., Vadim V. Fedorov, Richard B. Schuessler, Andrew M. Rollins, and Igor R. Efimov. 2012. “Quantification of Fiber Orientation in the Canine Atrial Pacemaker Complex Using Optical Coherence Tomography.” *Journal of Biomedical Optics* 17 (7): 71309. doi:10.1117/1.JBO.17.7.071309.
- Brooks, A., V. Schinde, A. C. Bateman, and P. J. Gallagher. 2003. “Interstitial Fibrosis in the Dilated Non-Ischaemic Myocardium.” *Heart (British Cardiac Society)* 89 (10): 1255–56.
- Cassidy, Paul J., Jürgen E. Schneider, Stuart M. Grieve, Craig Lygate, Stefan Neubauer, and Kieran Clarke. 2004. “Assessment of Motion Gating Strategies for Mouse Magnetic Resonance at High Magnetic Fields.” *Journal of Magnetic Resonance Imaging: JMRI* 19 (2): 229–37. doi:10.1002/jmri.10454.
- Castonguay, Alexandre, Pramod K. Avti, Mohammad Moeini, Philippe Pouliot, Maryam S. Tabatabaei, Samuel Bélanger, and Frédéric Lesage. 2015. “Investigating the Correlation between White Matter and Microvasculature Changes in Aging Using Large Scale Optical Coherence Tomography and Confocal Fluorescence Imaging Combined with Tissue Sectioning.” In , edited by Daniel L. Farkas, Dan V. Nicolau, and Robert C. Leif, 93281M. doi:10.1117/12.2077830.



- Fan, Chuanmao, and Gang Yao. 2013. "Imaging Myocardial Fiber Orientation Using Polarization Sensitive Optical Coherence Tomography." *Biomedical Optics Express* 4 (3): 460. doi:10.1364/BOE.4.000460.
- Fleming, Christine P., Crystal M. Ripplinger, Bryan Webb, Igor R. Efimov, and Andrew M. Rollins. 2008. "Quantification of Cardiac Fiber Orientation Using Optical Coherence Tomography." *Journal of Biomedical Optics* 13 (3): 30505. doi:10.1117/1.2937470.
- Gerstenblith, G., J. Frederiksen, F. C. Yin, N. J. Fortuin, E. G. Lakatta, and M. L. Weisfeldt. 1977. "Echocardiographic Assessment of a Normal Adult Aging Population." *Circulation* 56 (2): 273–78.
- Goergen, Craig J., Howard H. Chen, Sava Sakadžić, Vivek J. Srinivasan, and David E. Sosnovik. 2016. "Microstructural Characterization of Myocardial Infarction with Optical Coherence Tractography and Two-photon Microscopy." *Physiological Reports* 4 (18): e12894. doi:10.14814/phy2.12894.
- Goergen, Craig J., Harsha Radhakrishnan, Sava Sakadžić, Emiri T. Mandeville, Eng H. Lo, David E. Sosnovik, and Vivek J. Srinivasan. 2012. "Optical Coherence Tractography Using Intrinsic Contrast." *Optics Letters* 37 (18): 3882. doi:10.1364/OL.37.003882.
- Haider, Agha W., Martin G. Larson, Emelia J. Benjamin, and Daniel Levy. 1998. "Increased Left Ventricular Mass and Hypertrophy Are Associated with Increased Risk for Sudden Death." *Journal of the American College of Cardiology* 32 (5): 1454–59. doi:10.1016/S0735-1097(98)00407-0.
- Heiberg, Einar, Jane Sjögren, Martin Ugander, Marcus Carlsson, Henrik Engblom, and Håkan Arheden. 2010. "Design and Validation of Segment--Freely Available Software for Cardiovascular Image Analysis." *BMC Medical Imaging* 10 (January): 1. doi:10.1186/1471-2342-10-1.
- Hohmann, Martin, B. Lengenfelder, R. Kanawade, F. Klämpfl, and Michael Schmidt. 2015. "Extension of Depth-Resolved Reconstruction of Attenuation Coefficients in Optical Coherence Tomography for Slim Samples." In , edited by Takashige Omatsu, Yoshio Hayasaki, Yusuke Ogura, Yasuyuki Ozeki, and Seigo Ohno, 97920P. doi:10.1117/12.2205030.

- Lakatta, E. G. 2003a. "Arterial and Cardiac Aging: Major Shareholders in Cardiovascular Disease Enterprises: Part I: Aging Arteries: A 'Set Up' for Vascular Disease." *Circulation* 107 (1): 139–46. doi:10.1161/01.CIR.0000048892.83521.58.
- . 2003b. "Arterial and Cardiac Aging: Major Shareholders in Cardiovascular Disease Enterprises: Part II: The Aging Heart in Health: Links to Heart Disease." *Circulation* 107 (2): 346–54. doi:10.1161/01.CIR.0000048893.62841.F7.
- Lefebvre, Joël, Alexandre Castonguay, Philippe Pouliot, Maxime Descoteaux, and Frédéric Lesage. 2017. "Whole Mouse Brain Imaging Using Optical Coherence Tomography: Reconstruction, Normalization, Segmentation, and Comparison with Diffusion MRI." *Neurophotonics* 4 (4): 41501. doi:10.1117/1.NPh.4.4.041501.
- LeGrice, I. J., B. H. Smaill, L. Z. Chai, S. G. Edgar, J. B. Gavin, and P. J. Hunter. 1995. "Laminar Structure of the Heart: Ventricular Myocyte Arrangement and Connective Tissue Architecture in the Dog." *The American Journal of Physiology* 269 (2 Pt 2): H571–582.
- Lesage, F., A. Castonguay, P. L. Tardif, J. Lefebvre, and B. Li. 2015. "Investigating the Impact of Blood Pressure Increase to the Brain Using High Resolution Serial Histology and Image Processing." In , edited by Manos Papadakis, Vivek K. Goyal, and Dimitri Van De Ville, 95970M. doi:10.1117/12.2189110.
- Levy, Daniel, Robert J. Garrison, Daniel D. Savage, William B. Kannel, and William P. Castelli. 1990. "Prognostic Implications of Echocardiographically Determined Left Ventricular Mass in the Framingham Heart Study." *New England Journal of Medicine* 322 (22): 1561–66. doi:10.1056/NEJM199005313222203.
- Li, Wen, Ming Lu, Suhanti Banerjee, Jia Zhong, Allen Ye, Joseph Molter, and Xin Yu. 2009. "Ex Vivo Diffusion Tensor MRI Reflects Microscopic Structural Remodeling Associated with Aging and Disease Progression in Normal and Cardiomyopathic Syrian Hamsters." *NMR in Biomedicine* 22 (8): 819–25. doi:10.1002/nbm.1394.
- Mosterd, A., A. W. Hoes, M. C. de Bruyne, J. W. Deckers, D. T. Linker, A. Hofman, and D. E. Grobbee. 1999. "Prevalence of Heart Failure and Left Ventricular Dysfunction in the General Population; The Rotterdam Study." *European Heart Journal* 20 (6): 447–55.

- Otsu, Nobuyuki. 1979. "A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms." *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics* 9 (1): 62–66. doi:10.1109/TSMC.1979.4310076.
- Ragan, Timothy, Lolahon R Kadiri, Kannan Umadevi Venkataraju, Karsten Bahlmann, Jason Sutin, Julian Taranda, Ignacio Arganda-Carreras, Yongsoo Kim, H Sebastian Seung, and Pavel Osten. 2012. "Serial Two-Photon Tomography for Automated Ex Vivo Mouse Brain Imaging." *Nature Methods* 9 (3): 255–58. doi:10.1038/nmeth.1854.
- Reese, Timothy G., Robert M. Weisskoff, R. Neil Smith, Bruce R. Rosen, Robert E. Dinsmore, and Van J. Wedeen. 1995. "Imaging Myocardial Fiber Architecture in Vivo with Magnetic Resonance." *Magnetic Resonance in Medicine* 34 (6): 786–91. doi:10.1002/mrm.1910340603.
- Schneider, Jürgen E., Paul J. Cassidy, Craig Lygate, Damian J. Tyler, Frank Wiesmann, Stuart M. Grieve, Karen Hulbert, Kieran Clarke, and Stefan Neubauer. 2003. "Fast, High-Resolution in Vivo Cine Magnetic Resonance Imaging in Normal and Failing Mouse Hearts on a Vertical 11.7 T System." *Journal of Magnetic Resonance Imaging: JMRI* 18 (6): 691–701. doi:10.1002/jmri.10411.
- Schulman, S. P., E. G. Lakatta, J. L. Fleg, L. Lakatta, L. C. Becker, and G. Gerstenblith. 1992. "Age-Related Decline in Left Ventricular Filling at Rest and Exercise." *The American Journal of Physiology* 263 (6 Pt 2): H1932-1938.
- Scollan, D. F., A. Holmes, R. Winslow, and J. Forder. 1998. "Histological Validation of Myocardial Microstructure Obtained from Diffusion Tensor Magnetic Resonance Imaging." *The American Journal of Physiology* 275 (6 Pt 2): H2308-2318.
- Sosnovik, David E., Choukri Mekkaoui, Shuning Huang, Howard H. Chen, Guangping Dai, Christian T. Stoeck, Soeun Ngoy, et al. 2014. "Microstructural Impact of Ischemia and Bone Marrow-Derived Cell Therapy Revealed with Diffusion Tensor Magnetic Resonance Imaging Tractography of the Heart in Vivo." *Circulation* 129 (17): 1731–41. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005841.

- Sosnovik, David E, Ruopeng Wang, Guangping Dai, Timothy G Reese, and Van J Wedeen. 2009. "Diffusion MR Tractography of the Heart." *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance* 11 (1): 47. doi:10.1186/1532-429X-11-47.
- Streeter, D. D., and W. T. Hanna. 1973. "Engineering Mechanics for Successive States in Canine Left Ventricular Myocardium. II. Fiber Angle and Sarcomere Length." *Circulation Research* 33 (6): 656–64.
- Streeter, D. D., H. M. Spotnitz, D. P. Patel, J. Ross, and E. H. Sonnenblick. 1969. "Fiber Orientation in the Canine Left Ventricle during Diastole and Systole." *Circulation Research* 24 (3): 339–47. doi:10.1161/01.RES.24.3.339.
- Streeter, Daniel D., and David L. Bassett. 1966. "An Engineering Analysis of Myocardial Fiber Orientation in Pig's Left Ventricle in Systole." *The Anatomical Record* 155 (4): 503–11. doi:10.1002/ar.1091550403.
- Strijkers, Gustav J., Annemiek Bouts, W. Matthijs Blankesteyn, Tim H. J. M. Peeters, Anna Vilanova, Mischa C. van Prooijen, Honorius M. H. F. Sanders, Edwin Heijman, and Klaas Nicolay. 2009. "Diffusion Tensor Imaging of Left Ventricular Remodeling in Response to Myocardial Infarction in the Mouse." *NMR in Biomedicine* 22 (2): 182–90. doi:10.1002/nbm.1299.
- Swinne, C. J., E. P. Shapiro, S. D. Lima, and J. L. Fleg. 1992. "Age-Associated Changes in Left Ventricular Diastolic Performance during Isometric Exercise in Normal Subjects." *The American Journal of Cardiology* 69 (8): 823–26.
- Taccardi, B., E. Macchi, R. L. Lux, P. R. Ershler, S. Spaggiari, S. Baruffi, and Y. Vyhmeister. 1994. "Effect of Myocardial Fiber Direction on Epicardial Potentials." *Circulation* 90 (6): 3076–90. doi:10.1161/01.CIR.90.6.3076.
- Tardif, Pier-Luc, Marie-Jeanne Bertrand, Maxime Abran, Alexandre Castonguay, Joël Lefebvre, Barbara Stähli, Nolwenn Merlet, et al. 2016. "Validating Intravascular Imaging with Serial Optical Coherence Tomography and Confocal Fluorescence Microscopy." *International Journal of Molecular Sciences* 17 (12): 2110. doi:10.3390/ijms17122110.

- Vermeer, K. A., J. Mo, J. J. A. Weda, H. G. Lemij, and J. F. de Boer. 2014. "Depth-Resolved Model-Based Reconstruction of Attenuation Coefficients in Optical Coherence Tomography." *Biomedical Optics Express* 5 (1): 322. doi:10.1364/BOE.5.000322.
- Wang, Hui, Adam J. Black, Junfeng Zhu, Tyler W. Stigen, Muhammad K. Al-Qaisi, Theoden I. Netoff, Aviva Abosch, and Taner Akkin. 2011. "Reconstructing Micrometer-Scale Fiber Pathways in the Brain: Multi-Contrast Optical Coherence Tomography Based Tractography." *NeuroImage* 58 (4): 984–92. doi:10.1016/j.neuroimage.2011.07.005.
- Wang, Hui, Junfeng Zhu, and Taner Akkin. 2014. "Serial Optical Coherence Scanner for Large-Scale Brain Imaging at Microscopic Resolution." *NeuroImage* 84 (January): 1007–17. doi:10.1016/j.neuroimage.2013.09.063.
- Wang, Y., K. Zhang, N. B. Wasala, X. Yao, D. Duan, and G. Yao. 2014. "Histology Validation of Mapping Depth-Resolved Cardiac Fiber Orientation in Fresh Mouse Heart Using Optical Polarization Tractography." *Biomedical Optics Express* 5 (8): 2843. doi:10.1364/BOE.5.002843.
- Wang, Yuanbo, and Gang Yao. 2013. "Optical Tractography of the Mouse Heart Using Polarization-Sensitive Optical Coherence Tomography." *Biomedical Optics Express* 4 (11): 2540. doi:10.1364/BOE.4.002540.

## CHAPITRE 6 DISCUSSION GÉNÉRALE

Les travaux présentés dans cette thèse avaient tous comme finalité la conception d'une plateforme d'imagerie capable d'imager de gros échantillons de tissu biologique à haute résolution, dans le but de faire des études de groupe sur un modèle animal et de répondre à des questions spécifiques d'ordre physiologique. Pour y arriver, les objectifs développés représentent chacun une étape déterminante vers la finalité du travail. D'abord, il a fallu construire le microscope tomographique sériel employant la tomographie par cohérence optique. La seconde étape consistait en une validation du système, pour s'assurer que le tissu imagé donne une représentation fidèle de l'échantillon intact. Finalement, la réalisation des deux premiers objectifs a permis d'utiliser le système pour mesurer l'effet du vieillissement normal sur le cœur en comparant un groupe de souris jeunes à un groupe de souris âgées, répondant du coup à l'objectif général de la thèse.

### 6.1 Objectif 1

Dans un premier temps, la conception d'un microscope tomographique sériel fut réalisée permettant d'imager automatiquement un organe de petit animal en entier, puis de le reconstruire pour en avoir une représentation tridimensionnelle. Son développement fut un processus complexe, avec son lot de difficultés et de compromis nécessaires.

D'abord parmi une vaste possibilité de modalités d'imagerie, notre choix s'est arrêté sur la tomographie par cohérence optique. L'OCT comporte de nombreuses caractéristiques qui en font un choix de prédilection pour les imageurs sériels. La première étant la possibilité d'obtenir des données volumétriques avec un seul balayage de la surface de l'échantillon. Ces données volumétriques sont accompagnées d'une bonne résolution axiale, dictée par la largeur spectrale de la source lumineuse. La fréquence élevée du balayage de la source permet aussi d'acquérir les données à haut débit. La longueur d'onde dans le proche infrarouge de la source laser permet aussi de pénétrer profondément dans le tissu, pour imager jusqu'à quelques centaines de micromètres de la surface. De plus, le tissu ne requiert aucun traitement particulier car l'OCT mesure la réflectance aux interfaces dans le tissu. Le signal perçu est donc limité au contraste

endogène et ne permet pas d'obtenir une information moléculaire de l'échantillon. À cet effet, la microscopie 2Ph en fluorescence est largement utilisée pour les microscopes tomographiques sériels. En utilisant des modèles animaux transgéniques ou des agents de contraste injectable, la microscopie en fluorescence offre beaucoup de liberté quant au contraste à imager. La petite section efficace de la microscopie 2Ph permet d'avoir une résolution axiale comparable à l'OCT. Toutefois, pour avoir un échantillonnage en profondeur similaire à l'OCT, il faut imager plusieurs plans axiaux, pour une même section de tissu exposée. On se retrouve donc avec un temps d'acquisition beaucoup plus long.

Utilisation de l'OCT comme modalité d'imagerie influence le choix de l'optique dans la conception du microscope. Puisque l'OCT mesure l'information sur une colonne, il est important que la résolution latérale change peu en s'éloignant du plan focal. Pour y parvenir, on privilégie l'utilisation d'un objectif à faible NA. Avec de tels objectifs, la distance de Rayleigh sur laquelle la résolution change peu est grande, mais la résolution latérale est faible. Il y a donc un compromis à faire entre résolution et profondeur de champ. Il aurait été envisageable d'utiliser un objectif à grand NA pour obtenir une meilleure résolution latérale, mais de nombreux problèmes seraient à considérer. Puisque la qualité de l'image se dégraderait rapidement en s'éloignant du plan focal, il faudrait imager à plusieurs profondeurs pour une même section exposée de tissu, multipliant le temps d'acquisition. De plus, une résolution augmentée s'accompagne aussi d'une hausse importante de la taille des jeux de données. À titre comparatif, l'acquisition d'un cerveau de souris de l'ordre de 500 mm<sup>3</sup> avec le système présenté dans cette thèse nécessitait approximativement 5 heures et occupait un espace disque de 300 Go pour un voxel de (4,88 x 4,88 x 6,5) µm, tandis que des essais avec un objectif 10x permettait d'obtenir un voxel de (1,95x1,95x6,5) µm, générant des jeux de données de ~2 To acquis en 3 jours. Aussi, puisque les objectifs à grand NA ont un champ de vue réduit et que l'intensité du signal chute rapidement hors du plan focal, le repérage de l'interface eau-tissu s'avèrerait difficile, particulièrement lorsqu'il y a des erreurs de coupe.

Les problèmes de sectionnement du tissu demeurent la plus grande incertitude lors de l'acquisition des données. En effet, si l'échantillon est mal ancré dans la matrice de soutien, celui-ci peut se décoller complètement et sortir du moule d'agarose pendant l'acquisition. Des procédures d'oxydation de l'agarose pour créer des liens covalents à l'interface agarose/tissu permettent de maintenir l'échantillon solidement ancré, mais leur utilité avec des tissus rigides

demeure limitée. La nature du tissu a aussi un impact sur l'efficacité de la coupe. Par exemple, les sillons présents dans le cervelet de la souris amènent des régions distinctes, d'où peuvent se créer des sauts dans l'interface de la coupe. D'autres tissus, tels que l'aorte, sont rigides au point où la lame du vibratome ne parvient pas toujours à faire une coupe franche. Dans ce cas, on s'avère à imager profondément dans le tissu et l'intensité du signal s'en trouve grandement affectée. Ces problèmes de coupes inégales prennent de l'importance lorsqu'on utilise un objectif à grand NA. En effet, si l'interface de tissu n'est pas parfaitement plane, il sortira du plan focal de l'objectif rapidement et la qualité de l'image résultante sera grandement affectée.

## 6.2 Objectif 2

Une fois la plateforme d'imagerie développée, s'enchaînait la seconde étape du projet qui consistait en une validation du système. Il était question ici de vérifier si le sectionnement du tissu déformerait ou non l'échantillon imagé et de vérifier l'efficacité des algorithmes de reconstruction pour reconstituer le tissu en 3D. À l'aide d'outils d'analyses développés pour l'IRM (ANTs), les différentes régions du cerveau ont été étiquetées en l'alignant sur l'atlas Allen. Une analyse des champs de déformation entre *in vivo* et *ex vivo* a démontré que les déformations causées par la plateforme d'imagerie étaient non significatives. Toutefois, les outils d'analyse de ANTs n'alignent pas de façon impeccable deux jeux de données. Effectivement, des erreurs d'alignement surviennent particulièrement dans les régions ne possédant pas de frontières bien définies, telles que dans les structures thalamiques. Les structures possédant des délimitations claires, comme les ventricules et le cortex cérébral se recalent beaucoup plus efficacement.

Ces problèmes d'alignement avec ANTs peuvent limiter les conclusions tirées quant aux déformations subies par le tissu. Ceci peut affecter, par exemple, la mesure d'épaisseur corticale. La surface inférieure du cortex cérébral est délimitée par le corps calleux. Tel que mesuré dans la section 4.3, la forme particulière du corps calleux en fait une région où l'alignement est de piètre qualité. Ainsi, dans une étude où l'on chercherait à observer un changement d'épaisseur corticale entre deux groupes de souris, les erreurs d'alignement de ANTs pourraient être telles qu'elles masqueraient une faible différence d'épaisseur corticale sous-jacente.



De plus, il a un certain danger à aligner des jeux de données acquis avec différentes modalités d'imagerie. Avec les séquences utilisées pour les acquisitions à l'IRM, les contrastes générés ne sont pas les mêmes que pour l'OCT. En OCT, le contraste des fibres myélinisées varie en fonction de leur orientation : lorsqu'elles sont perpendiculaires à l'axe optique, elle génère un fort signal qui devient faible lorsqu'elles sont parallèles à l'axe optique. En IRM, le contraste de la matière blanche reste uniforme à travers le cerveau. D'autre part, l'atlas Allen utilisé pour étiqueter les régions du cerveau fut acquis avec le signal d'autofluorescence du tissu en microscopie deux photons, où le contraste est relié à la densité cellulaire et à la taille des noyaux cellulaires. Ces différences quant à l'origine du contraste peuvent induire des erreurs pour les algorithmes d'alignement de cerveaux, qui sont basées sur des changements d'intensité du signal dans le tissu.

Somme toute, il a été montré que les déformations causées par le microscope sériel étaient non significatives par rapport aux erreurs d'alignement. En effet, le système est basé sur l'imagerie bloc sur face où la surface de tissu imagée est rattachée à l'organe. Cette section de tissu n'a donc pas subi de déformation due au tranchage et a conservé sa topologie tridimensionnelle. Il est aussi démontré que la procédure de fixation utilisée déforme peu le tissu. L'utilisation d'un vibratome plutôt que d'un microtome permet d'imager des tissus frais. Ainsi, le seul traitement subi par le tissu ici est une perfusion au PFA pour le préserver jusqu'au moment de l'acquisition. En perfusant l'animal au PFA, on permet au produit fixatif d'être uniformément distribué dans le cerveau. Dans le cas où l'animal serait sacrifié puis l'organe submergé dans le milieu fixatif, il se produirait une diffusion lente du PFA dans le cerveau, créant ainsi des contraintes et déformant de façon non uniforme le tissu. Toutefois, certaines déformations du tissu qui ne sont pas dues à la plateforme d'imagerie sont inévitables. Par exemple, l'affaissement des ventricules dans le cerveau est une déformation qui apparaît *ex vivo*. Cet affaissement est dû à l'absence de la pression intracrânienne qui maintient la forme des ventricules. Ces déformations demeurent cependant minimales.

Dans l'étude présentée au chapitre 4, les cerveaux ont aussi été imagés *ex vivo* à l'IRM pour obtenir une meilleure résolution spatiale qu'à l'IRM *in vivo*. Ces séquences à l'IRM *ex vivo* avaient une durée de plus de 18 heures en plus de soumettre les échantillons à d'intenses gradients. Ces conditions extrêmes ont eu pour effet de modifier la nature du tissu, se manifestant en des problèmes de tranchage au vibratome. Pour de futures expérimentations, il est donc

important de noter que l'immersion de l'échantillon pour une période prolongée dans la Fomblin, plutôt que dans le PFA, et les intenses gradients qui génèrent de la chaleur dans l'échantillon sont à l'origine de changements de propriétés mécaniques du tissu.

### 6.3 Objectif 3

Suivant la confirmation que le système donnait une représentation fidèle du tissu, il était alors de mise d'accomplir une étude de groupe où l'on tentait de montrer des changements structurels au niveau microscopique dans un organe de petit animal en entier. Ici, l'effet du vieillissement normal sur le cœur de la souris a été évalué. En imageant avec la plateforme d'imagerie les cœurs d'un groupe de souris jeunes et âgés, il a été possible de faire pour la première fois une étude de groupe en utilisant l'histologie sérielle d'organe entier. Des changements microscopiques dans l'organisation des fibres musculaires dans le cœur en entier ont été détectés entre les deux groupes de souris. Ces différences sont caractérisées par un moindre changement d'orientation des fibres du myocarde chez les souris âgées ainsi que par l'apparition d'espaces interstitiels entre les fibres musculaires de l'endocarde. Des mesures en IRM fonctionnelle acquises a priori ont montré que le vieillissement engendrait une réduction significative de la fraction d'éjection, pointant vers un lien de causalité entre les changements structurels observés *ex vivo* et les mesures fonctionnelles.

En comparant les deux groupes, une réduction significative de l'atténuation de la lumière a été mesurée. Les données acquises en OCT ne permettent toutefois pas de vérifier si la nature du tissu s'est trouvée changée. Le vieillissement du cœur est connu pour entraîner une croissance du tissu fibreux dans le myocarde. Le marquage immunohistologique des tranches de cœur aurait permis de soutirer davantage d'information sur la nature des changements tissulaires.

Tel qu'indiqué à la section 6.1, le sectionnement du tissu cardiaque posait problème. D'abord, le vide dans les ventricules faisait en sorte que les parois n'étaient pas supportées à l'intérieur des chambres, résultant en des coupes inégales. L'injection d'agarose liquide dans les ventricules avec une seringue a permis de remplir ceux-ci, soutenant ainsi solidement le tissu. Le cœur présente aussi différents types de tissus avec leurs propres propriétés mécaniques. À la base du cœur se trouvent les vaisseaux sanguins constitués de tissu élastique, difficile à couper au

vibratome et réduisant drastiquement la qualité des images. Dans le cas de cette étude, les cœurs ont simplement été placés avec l'apex vers le haut pour avoir une bonne qualité d'images dans les ventricules, sacrifiant du même coup l'imagerie de la base du cœur. Pour ces multitudes de tissus difficiles à trancher, il aurait été intéressant de faire une revue de littérature pour voir s'il existe des traitements pour changer leurs propriétés mécaniques, pour ainsi faciliter leur sectionnement au vibratome.

## CHAPITRE 7 CONCLUSION ET RECOMMANDATIONS

Cette thèse s'inscrit dans la discipline de l'histologie où il y a un réel besoin d'avoir une vision plus globale de changements microscopiques qui s'opèrent dans les organes en entier. Les chercheurs provenant des domaines de la médecine ou de la biologie font appel aux récents développements technologiques pour répondre à leurs besoins. Ce projet se trouve ainsi au croisement du domaine du vivant et de l'ingénierie. Le système développé permet d'imager à grande échelle des échantillons biologiques. L'utilisation de la tomographie par cohérence optique comme modalités d'imagerie se limite toutefois à imager la structure du tissu et non la composition moléculaire.

Tant en médecine qu'en biologie, l'imagerie en fluorescence a pris une place prépondérante dans l'analyse des tissus en histologie. Aujourd'hui, cette technique est présente partout et demeure l'étalon d'or pour l'imagerie moléculaire, via l'utilisation de modèles animaux transgéniques ou l'immunohistologie, par exemple. À ce jour, plusieurs groupes s'intéressent à concevoir des microscopes tomographiques sériels utilisant l'imagerie deux photons pour imager la fluorescence dans le tissu. Dans ce projet, il aura été intéressant de combiner l'OCT à l'imagerie deux photons en fluorescence. Ce faisant, en plus d'imager la structure du tissu, une information complémentaire concernant la composition moléculaire du tissu aurait pu être extraite. Bien que la conception de ce système comporte son lot de défis d'ingénierie (pièces optiques accommodant la vaste plage de longueurs d'onde, sectionnement optique en 2Ph, *etc.*), il serait tout à fait réalisable dans le cadre d'un projet doctoral.

Ultimement, la microscopie tomographique sérielle se déplacera vers l'histologie de l'humain où des banques de tissus pourront être utilisées pour étudier des modèles de maladies propres à notre espèce. La grande taille des organes chez l'humain posera toutefois de gros défis techniques, où des outils sophistiqués pour gérer et analyser ces immenses jeux de données seront nécessaires.

## BIBLIOGRAPHIE

- Agrawal, Anant, T. Joshua Pfefer, Peter D. Woolliams, Peter H. Tomlins, and George Nehmetallah. 2017. "Methods to Assess Sensitivity of Optical Coherence Tomography Systems." *Biomedical Optics Express* 8 (2): 902. doi:10.1364/BOE.8.000902.
- Alvarez, Luis, Luis Baumela, Pedro Henriquez, and Pablo Marquez-Neila. 2010. "Morphological Snakes." In , 2197–2202. IEEE. doi:10.1109/CVPR.2010.5539900.
- Amato, Stephen P., Feng Pan, Joel Schwartz, and Timothy M. Ragan. 2016. "Whole Brain Imaging with Serial Two-Photon Tomography." *Frontiers in Neuroanatomy* 10 (March). doi:10.3389/fnana.2016.00031.
- Ambrosi, Christina M., Vadim V. Fedorov, Richard B. Schuessler, Andrew M. Rollins, and Igor R. Efimov. 2012. "Quantification of Fiber Orientation in the Canine Atrial Pacemaker Complex Using Optical Coherence Tomography." *Journal of Biomedical Optics* 17 (7): 71309. doi:10.1117/1.JBO.17.7.071309.
- Amunts, K., C. Lepage, L. Borgeat, H. Mohlberg, T. Dickscheid, M.-E. Rousseau, S. Bludau, et al. 2013. "BigBrain: An Ultrahigh-Resolution 3D Human Brain Model." *Science* 340 (6139): 1472–75. doi:10.1126/science.1235381.
- Aswendt, Markus, Martin Schwarz, Walid M. Abdelmoula, Jouke Dijkstra, and Stefanie Dedeurwaerdere. 2017. "Whole-Brain Microscopy Meets In Vivo Neuroimaging: Techniques, Benefits, and Limitations." *Molecular Imaging and Biology* 19 (1): 1–9. doi:10.1007/s11307-016-0988-z.
- Avants, B. B., C. L. Epstein, M. Grossman, and J. C. Gee. 2008. "Symmetric Diffeomorphic Image Registration with Cross-Correlation: Evaluating Automated Labeling of Elderly and Neurodegenerative Brain." *Medical Image Analysis* 12 (1): 26–41. doi:10.1016/j.media.2007.06.004.
- Avants, Brian B., Nicholas J. Tustison, Gang Song, Philip A. Cook, Arno Klein, and James C. Gee. 2011. "A Reproducible Evaluation of ANTs Similarity Metric Performance in Brain

- Image Registration.” *NeuroImage* 54 (3): 2033–44. doi:10.1016/j.neuroimage.2010.09.025.
- Avants, Brian B., Nicholas J. Tustison, Michael Stauffer, Gang Song, Baohua Wu, and James C. Gee. 2014. “The Insight ToolKit Image Registration Framework.” *Frontiers in Neuroinformatics* 8: 44. doi:10.3389/fninf.2014.00044.
- Avants, Brian B., Paul Yushkevich, John Pluta, David Minkoff, Marc Korczykowski, John Detre, and James C. Gee. 2010. “The Optimal Template Effect in Hippocampus Studies of Diseased Populations.” *NeuroImage* 49 (3): 2457–66. doi:10.1016/j.neuroimage.2009.09.062.
- Becker, Klaus, Nina Jährling, Saiedeh Saghafi, Reto Weiler, and Hans-Ulrich Dodt. 2012. “Chemical Clearing and Dehydration of GFP Expressing Mouse Brains.” Edited by Malú G. Tansey. *PLoS ONE* 7 (3): e33916. doi:10.1371/journal.pone.0033916.
- Ben Arous, Juliette. 2011. “Single Myelin Fiber Imaging in Living Rodents without Labeling by Deep Optical Coherence Microscopy.” *Journal of Biomedical Optics* 16 (11): 116012. doi:10.1117/1.3650770.
- Benveniste, H., K. Kim, L. Zhang, and G. A. Johnson. 2000. “Magnetic Resonance Microscopy of the C57BL Mouse Brain.” *NeuroImage* 11 (6 Pt 1): 601–11. doi:10.1006/nimg.2000.0567.
- Bowen, Chris V., Joseph S. Gati, and Ravi S. Menon. 2006. “Robust Prescan Calibration for Multiple Spin-Echo Sequences: Application to FSE and B-SSFP.” *Magnetic Resonance Imaging* 24 (7): 857–67. doi:10.1016/j.mri.2006.04.008.
- Bracegirdle, B. 1977. “The History of Histology: A Brief Survey of Sources.” *History of Science* 15 (2): 77–101. doi:10.1177/007327537701500201.
- Brooks, A., V. Schinde, A. C. Bateman, and P. J. Gallagher. 2003. “Interstitial Fibrosis in the Dilated Non-Ischaemic Myocardium.” *Heart (British Cardiac Society)* 89 (10): 1255–56.
- Cassidy, Paul J., Jürgen E. Schneider, Stuart M. Grieve, Craig Lygate, Stefan Neubauer, and Kieran Clarke. 2004. “Assessment of Motion Gating Strategies for Mouse Magnetic Resonance at High Magnetic Fields.” *Journal of Magnetic Resonance Imaging: JMRI* 19 (2): 229–37. doi:10.1002/jmri.10454.

- Castonguay, Alexandre, Pramod K. Avti, Mohammad Moeini, Philippe Pouliot, Maryam S. Tabatabaei, Samuel B?langer, and Fr?d?ric Lesage. 2015. "Investigating the Correlation between White Matter and Microvasculature Changes in Aging Using Large Scale Optical Coherence Tomography and Confocal Fluorescence Imaging Combined with Tissue Sectioning." In , edited by Daniel L. Farkas, Dan V. Nicolau, and Robert C. Leif, 93281M. doi:10.1117/12.2077830.
- Chanraud, Sandra, Natalie Zahr, Edith V. Sullivan, and Adolf Pfefferbaum. 2010. "MR Diffusion Tensor Imaging: A Window into White Matter Integrity of the Working Brain." *Neuropsychology Review* 20 (2): 209–25. doi:10.1007/s11065-010-9129-7.
- Chung, Kwanghun, Jenelle Wallace, Sung-Yon Kim, Sandhiya Kalyanasundaram, Aaron S. Andalman, Thomas J. Davidson, Julie J. Mirzabekov, et al. 2013. "Structural and Molecular Interrogation of Intact Biological Systems." *Nature* 497 (7449): 332–37. doi:10.1038/nature12107.
- Costantini, Irene, Jean-Pierre Ghobril, Antonino Paolo Di Giovanna, Anna Letizia Allegra Mascaro, Ludovico Silvestri, Marie Caroline M?llenbroich, Leonardo Onofri, et al. 2015. "A Versatile Clearing Agent for Multi-Modal Brain Imaging." *Scientific Reports* 5 (1). doi:10.1038/srep09808.
- Denk, W, J. Strickler, and W. Webb. 1990. "Two-Photon Laser Scanning Fluorescence Microscopy." *Science* 248 (4951): 73–76. doi:10.1126/science.2321027.
- Dodt, Hans-Ulrich, Ulrich Leischner, Anja Schierloh, Nina J?hrling, Christoph Peter Mauch, Katrin Deininger, Jan Michael Deussing, Matthias Eder, Walter Zieglg?nsberger, and Klaus Becker. 2007. "Ultramicroscopy: Three-Dimensional Visualization of Neuronal Networks in the Whole Mouse Brain." *Nature Methods* 4 (4): 331–36. doi:10.1038/nmeth1036.
- Double, K. L., G. M. Halliday, J. J. Kril, J. A. Harasty, K. Cullen, W. S. Brooks, H. Creasey, and G. A. Broe. 1996. "Topography of Brain Atrophy during Normal Aging and Alzheimer's Disease." *Neurobiology of Aging* 17 (4): 513–21.

- Drexler, Wolfgang, and James G. Fujimoto, eds. 2008. *Optical Coherence Tomography: Technology and Applications*. Biological and Medical Physics, Biomedical Engineering. Berlin: Springer.
- Economo, Michael N, Nathan G Clack, Luke D Lavis, Charles R Gerfen, Karel Svoboda, Eugene W Myers, and Jayaram Chandrashekar. 2016. "A Platform for Brain-Wide Imaging and Reconstruction of Individual Neurons." *eLife* 5 (January). doi:10.7554/eLife.10566.
- Eltoum, Isam, Jerry Fredenburgh, Russell B. Myers, and William E. Grizzle. 2001. "Introduction to the Theory and Practice of Fixation of Tissues." *Journal of Histotechnology* 24 (3): 173–90. doi:10.1179/014788801794812426.
- Ertürk, Ali, Klaus Becker, Nina Jährling, Christoph P Mauch, Caroline D Hojer, Jackson G Egen, Farida Hellal, Frank Bradke, Morgan Sheng, and Hans-Ulrich Dodt. 2012. "Three-Dimensional Imaging of Solvent-Cleared Organs Using 3DISCO." *Nature Protocols* 7 (11): 1983–95. doi:10.1038/nprot.2012.119.
- Evans, Conor L., Xiaoyin Xu, Santosh Kesari, X. Sunney Xie, Stephen T.C. Wong, and Geoffrey S. Young. 2007. "Chemically-Selective Imaging of Brain Structures with CARS Microscopy." *Optics Express* 15 (19): 12076. doi:10.1364/OE.15.012076.
- Fan, Chuanmao, and Gang Yao. 2013. "Imaging Myocardial Fiber Orientation Using Polarization Sensitive Optical Coherence Tomography." *Biomedical Optics Express* 4 (3): 460. doi:10.1364/BOE.4.000460.
- Fields, R. Douglas. 2008. "White Matter in Learning, Cognition and Psychiatric Disorders." *Trends in Neurosciences* 31 (7): 361–70. doi:10.1016/j.tins.2008.04.001.
- Fleming, Christine P., Crystal M. Ripplinger, Bryan Webb, Igor R. Efimov, and Andrew M. Rollins. 2008. "Quantification of Cardiac Fiber Orientation Using Optical Coherence Tomography." *Journal of Biomedical Optics* 13 (3): 30505. doi:10.1117/1.2937470.
- Franklin, Keith B. J. 2013. *Paxinos and Franklin's The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Fourth edition. Amsterdam: Academic Press, an imprint of Elsevier.
- Fu, Yan, T. B. Huff, Han-Wei Wang, Ji-Xin Cheng, and Haifeng Wang. 2008. "Ex Vivo and in Vivo Imaging of Myelin Fibers in Mouse Brain by Coherent Anti-Stokes Raman Scattering Microscopy." *Optics Express* 16 (24): 19396. doi:10.1364/OE.16.019396.



- Gerstenblith, G., J. Frederiksen, F. C. Yin, N. J. Fortuin, E. G. Lakatta, and M. L. Weisfeldt. 1977. "Echocardiographic Assessment of a Normal Adult Aging Population." *Circulation* 56 (2): 273–78.
- Goergen, Craig J., Howard H. Chen, Sava Sakadžić, Vivek J. Srinivasan, and David E. Sosnovik. 2016. "Microstructural Characterization of Myocardial Infarction with Optical Coherence Tractography and Two-photon Microscopy." *Physiological Reports* 4 (18): e12894. doi:10.14814/phy2.12894.
- Goergen, Craig J., Harsha Radhakrishnan, Sava Sakadžić, Emiri T. Mandeville, Eng H. Lo, David E. Sosnovik, and Vivek J. Srinivasan. 2012. "Optical Coherence Tractography Using Intrinsic Contrast." *Optics Letters* 37 (18): 3882. doi:10.1364/OL.37.003882.
- Gong, Hui, Dongli Xu, Jing Yuan, Xiangning Li, Congdi Guo, Jie Peng, Yuxin Li, et al. 2016. "High-Throughput Dual-Colour Precision Imaging for Brain-Wide Connectome with Cytoarchitectonic Landmarks at the Cellular Level." *Nature Communications* 7 (July): 12142. doi:10.1038/ncomms12142.
- Haider, Agha W., Martin G. Larson, Emelia J. Benjamin, and Daniel Levy. 1998. "Increased Left Ventricular Mass and Hypertrophy Are Associated with Increased Risk for Sudden Death." *Journal of the American College of Cardiology* 32 (5): 1454–59. doi:10.1016/S0735-1097(98)00407-0.
- Hamamatsu Photonics. 2014. "NanoZoomer Series." [www.hamamatsu.com](http://www.hamamatsu.com).
- Heiberg, Einar, Jane Sjögren, Martin Ugander, Marcus Carlsson, Henrik Engblom, and Håkan Arheden. 2010. "Design and Validation of Segment--Freely Available Software for Cardiovascular Image Analysis." *BMC Medical Imaging* 10 (January): 1. doi:10.1186/1471-2342-10-1.
- Hillmann, Dierck, Tim Bonin, Christian Lühns, Gesa Franke, Martin Hagen-Eggert, Peter Koch, and Gereon Hüttmann. 2012. "Common Approach for Compensation of Axial Motion Artifacts in Swept-Source OCT and Dispersion in Fourier-Domain OCT." *Optics Express* 20 (6): 6761–76.
- Hohmann, Martin, B. Lengenfelder, R. Kanawade, F. Klämpfl, and Michael Schmidt. 2015. "Extension of Depth-Resolved Reconstruction of Attenuation Coefficients in Optical

- Coherence Tomography for Slim Samples.” In , edited by Takashige Omatsu, Yoshio Hayasaki, Yusuke Ogura, Yasuyuki Ozeki, and Seigo Ohno, 97920P. doi:10.1117/12.2205030.
- Huang, D., E. A. Swanson, C. P. Lin, J. S. Schuman, W. G. Stinson, W. Chang, M. R. Hee, T. Flotte, K. Gregory, and C. A. Puliafito. 1991. “Optical Coherence Tomography.” *Science (New York, N.Y.)* 254 (5035): 1178–81.
- Huisken, Jan, and Didier Y. R. Stainier. 2007. “Even Fluorescence Excitation by Multidirectional Selective Plane Illumination Microscopy (mSPIM).” *Optics Letters* 32 (17): 2608–10.
- Jacques, Steven L. 2013. “Corrigendum: Optical Properties of Biological Tissues: A Review.” *Physics in Medicine and Biology* 58 (14): 5007–8. doi:10.1088/0031-9155/58/14/5007.
- Jeon, Sung W., Mark A. Shure, Ken B. Baker, David Huang, Andrew M. Rollins, Ali Chaharvi, and Ali R. Rezai. 2006. “A Feasibility Study of Optical Coherence Tomography for Guiding Deep Brain Probes.” *Journal of Neuroscience Methods* 154 (1–2): 96–101. doi:10.1016/j.jneumeth.2005.12.008.
- Jiang, Yi, and G. Allan Johnson. 2010. “Microscopic Diffusion Tensor Imaging of the Mouse Brain.” *NeuroImage* 50 (2): 465–71. doi:10.1016/j.neuroimage.2009.12.057.
- Jones, S. E., B. R. Buchbinder, and I. Aharon. 2000. “Three-Dimensional Mapping of Cortical Thickness Using Laplace’s Equation.” *Human Brain Mapping* 11 (1): 12–32.
- Kim, Sung-Yon, Kwanghun Chung, and Karl Deisseroth. 2013. “Light Microscopy Mapping of Connections in the Intact Brain.” *Trends in Cognitive Sciences* 17 (12): 596–99. doi:10.1016/j.tics.2013.10.005.
- Kitamura, Soichiro, Kuniaki Kiuchi, Toshiaki Taoka, Kazumichi Hashimoto, Shotaro Ueda, Fumihiko Yasuno, Masayuki Morikawa, Kimihiko Kichikawa, and Toshifumi Kishimoto. 2013. “Longitudinal White Matter Changes in Alzheimer’s Disease: A Tractography-Based Analysis Study.” *Brain Research* 1515 (June): 12–18.
- Klein, Arno, Jesper Andersson, Babak A. Ardekani, John Ashburner, Brian Avants, Ming-Chang Chiang, Gary E. Christensen, et al. 2009. “Evaluation of 14 Nonlinear Deformation Algorithms Applied to Human Brain MRI Registration.” *NeuroImage* 46 (3): 786–802. doi:10.1016/j.neuroimage.2008.12.037.

- Kremer, A., S. Lippens, S. Bartunkova, B. Asselbergh, C. Blanpain, M. Fendrych, A. Goossens, et al. 2015. "Developing 3D SEM in a Broad Biological Context." *Journal of Microscopy* 259 (2): 80–96. doi:10.1111/jmi.12211.
- Kuan, Leonard, Yang Li, Chris Lau, David Feng, Amy Bernard, Susan M. Sunkin, Hongkui Zeng, Chinh Dang, Michael Hawrylycz, and Lydia Ng. 2015. "Neuroinformatics of the Allen Mouse Brain Connectivity Atlas." *Methods* 73 (February): 4–17. doi:10.1016/j.ymeth.2014.12.013.
- Kwon, J. S., R. W. McCarley, Y. Hirayasu, J. E. Anderson, I. A. Fischer, R. Kikinis, F. A. Jolesz, and M. E. Shenton. 1999. "Left Planum Temporale Volume Reduction in Schizophrenia." *Archives of General Psychiatry* 56 (2): 142–48.
- Lakatta, E. G. 2003a. "Arterial and Cardiac Aging: Major Shareholders in Cardiovascular Disease Enterprises: Part I: Aging Arteries: A 'Set Up' for Vascular Disease." *Circulation* 107 (1): 139–46. doi:10.1161/01.CIR.0000048892.83521.58.
- . 2003b. "Arterial and Cardiac Aging: Major Shareholders in Cardiovascular Disease Enterprises: Part II: The Aging Heart in Health: Links to Heart Disease." *Circulation* 107 (2): 346–54. doi:10.1161/01.CIR.0000048893.62841.F7.
- Leahy, Conor, Harsha Radhakrishnan, and Vivek J. Srinivasan. 2013. "Volumetric Imaging and Quantification of Cytoarchitecture and Myeloarchitecture with Intrinsic Scattering Contrast." *Biomedical Optics Express* 4 (10): 1978. doi:10.1364/BOE.4.001978.
- Lefebvre, Joël, Alexandre Castonguay, and Frédéric Lesage. 2017. "White Matter Segmentation by Estimating Tissue Optical Attenuation from Volumetric OCT Massive Histology of Whole Rodent Brains." In , edited by Thomas G. Brown, Carol J. Cogswell, and Tony Wilson, 1007012. doi:10.1117/12.2251173.
- Lefebvre, Joël, Alexandre Castonguay, Philippe Pouliot, Maxime Descoteaux, and Frédéric Lesage. 2017. "Whole Mouse Brain Imaging Using Optical Coherence Tomography: Reconstruction, Normalization, Segmentation, and Comparison with Diffusion MRI." *Neurophotonics* 4 (4): 41501. doi:10.1117/1.NPh.4.4.041501.
- LeGrice, I. J., B. H. Smaill, L. Z. Chai, S. G. Edgar, J. B. Gavin, and P. J. Hunter. 1995. "Laminar Structure of the Heart: Ventricular Myocyte Arrangement and Connective

- Tissue Architecture in the Dog.” *The American Journal of Physiology* 269 (2 Pt 2): H571-582.
- LeGrice, I. J., Y. Takayama, and J. W. Covell. 1995. “Transverse Shear Along Myocardial Cleavage Planes Provides a Mechanism for Normal Systolic Wall Thickening.” *Circulation Research* 77 (1): 182–93. doi:10.1161/01.RES.77.1.182.
- Lesage, F., A. Castonguay, P. L. Tardif, J. Lefebvre, and B. Li. 2015. “Investigating the Impact of Blood Pressure Increase to the Brain Using High Resolution Serial Histology and Image Processing.” In , edited by Manos Papadakis, Vivek K. Goyal, and Dimitri Van De Ville, 95970M. doi:10.1117/12.2189110.
- Levy, Daniel, Robert J. Garrison, Daniel D. Savage, William B. Kannel, and William P. Castelli. 1990. “Prognostic Implications of Echocardiographically Determined Left Ventricular Mass in the Framingham Heart Study.” *New England Journal of Medicine* 322 (22): 1561–66. doi:10.1056/NEJM199005313222203.
- Li, A., H. Gong, B. Zhang, Q. Wang, C. Yan, J. Wu, Q. Liu, S. Zeng, and Q. Luo. 2010. “Micro-Optical Sectioning Tomography to Obtain a High-Resolution Atlas of the Mouse Brain.” *Science* 330 (6009): 1404–8. doi:10.1126/science.1191776.
- Li, Wen, Ming Lu, Suhanti Banerjee, Jia Zhong, Allen Ye, Joseph Molter, and Xin Yu. 2009. “*Ex Vivo* Diffusion Tensor MRI Reflects Microscopic Structural Remodeling Associated with Aging and Disease Progression in Normal and Cardiomyopathic Syrian Hamsters.” *NMR in Biomedicine* 22 (8): 819–25. doi:10.1002/nbm.1394.
- López-Muñoz, Francisco, Jesús Boya, and Cecilio Alamo. 2006. “Neuron Theory, the Cornerstone of Neuroscience, on the Centenary of the Nobel Prize Award to Santiago Ramón Y Cajal.” *Brain Research Bulletin* 70 (4–6): 391–405. doi:10.1016/j.brainresbull.2006.07.010.
- Márquez-Neila, Pablo, Luis Baumela, and Luis Alvarez. 2014. “A Morphological Approach to Curvature-Based Evolution of Curves and Surfaces.” *IEEE Transactions on Pattern Analysis and Machine Intelligence* 36 (1): 2–17. doi:10.1109/TPAMI.2013.106.
- Miller, Karla L., Charlotte J. Stagg, Gwenaëlle Douaud, Saad Jbabdi, Stephen M. Smith, Timothy E. J. Behrens, Mark Jenkinson, et al. 2011. “Diffusion Imaging of Whole, Post-Mortem

- Human Brains on a Clinical MRI Scanner.” *NeuroImage* 57 (1): 167–81. doi:10.1016/j.neuroimage.2011.03.070.
- Miyata, Jun, Kazuyuki Hirao, Chihiro Namiki, Hidenao Fukuyama, Tsutomu Okada, Yukio Miki, Takuji Hayashi, and Toshiya Murai. 2007. “Interfrontal Commissural Abnormality in Schizophrenia: Tractography-Assisted Callosal Parcellation.” *Schizophrenia Research* 97 (1-3): 236–41.
- Moles Lopez, Xavier, Etienne D’Andrea, Paul Barbot, Anne-Sophie Bridoux, Sandrine Rorive, Isabelle Salmon, Olivier Debeir, and Christine Decaestecker. 2013. “An Automated Blur Detection Method for Histological Whole Slide Imaging.” Edited by Arrate Muñoz-Barrutia. *PLoS ONE* 8 (12): e82710. doi:10.1371/journal.pone.0082710.
- Mosterd, A., A. W. Hoes, M. C. de Bruyne, J. W. Deckers, D. T. Linker, A. Hofman, and D. E. Grobbee. 1999. “Prevalence of Heart Failure and Left Ventricular Dysfunction in the General Population; The Rotterdam Study.” *European Heart Journal* 20 (6): 447–55.
- Nair, Aarti, Jeffrey M. Treiber, Dinesh K. Shukla, Patricia Shih, and Ralph-Axel Müller. 2013. “Impaired Thalamocortical Connectivity in Autism Spectrum Disorder: A Study of Functional and Anatomical Connectivity.” *Brain: A Journal of Neurology* 136 (Pt 6): 1942–55.
- Odgaard, A., K. Andersen, F. Melsen, and H. J. Gundersen. 1990. “A Direct Method for Fast Three-Dimensional Serial Reconstruction.” *Journal of Microscopy* 159 (Pt 3): 335–42.
- Oh, Seung Wook, Julie A. Harris, Lydia Ng, Brent Winslow, Nicholas Cain, Stefan Mihalas, Quanxin Wang, et al. 2014. “A Mesoscale Connectome of the Mouse Brain.” *Nature* 508 (7495): 207–14. doi:10.1038/nature13186.
- Otsu, Nobuyuki. 1979. “A Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms.” *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics* 9 (1): 62–66. doi:10.1109/TSMC.1979.4310076.
- Pantanowitz, Liron. 2010. “Digital Images and the Future of Digital Pathology.” *Journal of Pathology Informatics* 1 (1): 15. doi:10.4103/2153-3539.68332.
- Pantanowitz, Liron, AndrewJ Evans, JohnD Pfeifer, LauraC Collins, PaulN Valenstein, KeithJ Kaplan, DavidC Wilbur, and TerenceJ Colgan. 2011. “Review of the Current State of

- Whole Slide Imaging in Pathology.” *Journal of Pathology Informatics* 2 (1): 36. doi:10.4103/2153-3539.83746.
- Price, Diana L., Sunny K. Chow, Natalie A. B. Maclean, Hiroyuki Hakozaiki, Steve Peltier, Maryann E. Martone, and Mark H. Ellisman. 2006. “High-Resolution Large-Scale Mosaic Imaging Using Multiphoton Microscopy to Characterize Transgenic Mouse Models of Human Neurological Disorders.” *Neuroinformatics* 4 (1): 65–80. doi:10.1385/NI:4:1:65.
- Quester, Ralf, and Roland Schröder. 1997. “The Shrinkage of the Human Brain Stem during Formalin Fixation and Embedding in Paraffin.” *Journal of Neuroscience Methods* 75 (1): 81–89. doi:10.1016/S0165-0270(97)00050-2.
- Ragan, Timothy, Lolahon R Kadiri, Kannan Umadevi Venkataraju, Karsten Bahlmann, Jason Sutin, Julian Taranda, Ignacio Arganda-Carreras, Yongsoo Kim, H Sebastian Seung, and Pavel Osten. 2012. “Serial Two-Photon Tomography for Automated Ex Vivo Mouse Brain Imaging.” *Nature Methods* 9 (3): 255–58. doi:10.1038/nmeth.1854.
- Ragan, Timothy, Jeremy D. Sylvan, Ki Hean Kim, Hayden Huang, Karsten Bahlmann, Richard T. Lee, and Peter T. C. So. 2007. “High-Resolution Whole Organ Imaging Using Two-Photon Tissue Cytometry.” *Journal of Biomedical Optics* 12 (1): 14015. doi:10.1117/1.2435626.
- Reese, Timothy G., Robert M. Weisskoff, R. Neil Smith, Bruce R. Rosen, Robert E. Dinsmore, and Van J. Wedeen. 1995. “Imaging Myocardial Fiber Architecture in Vivo with Magnetic Resonance.” *Magnetic Resonance in Medicine* 34 (6): 786–91. doi:10.1002/mrm.1910340603.
- Richardson, Douglas S., and Jeff W. Lichtman. 2015. “Clarifying Tissue Clearing.” *Cell* 162 (2): 246–57. doi:10.1016/j.cell.2015.06.067.
- Rohlfing, Torsten, Robert Brandt, Randolph Menzel, and Calvin R. Maurer. 2004. “Evaluation of Atlas Selection Strategies for Atlas-Based Image Segmentation with Application to Confocal Microscopy Images of Bee Brains.” *NeuroImage* 21 (4): 1428–42. doi:10.1016/j.neuroimage.2003.11.010.

- Sallee, C. J., and D. F. Russell. 1993. "Embedding of Neural Tissue in Agarose or Glyoxyl Agarose for Vibratome Sectioning." *Biotechnic & Histochemistry: Official Publication of the Biological Stain Commission* 68 (6): 360–68.
- Schmitt, Andrea, Alkomiet Hasan, Oliver Gruber, and Peter Falkai. 2011. "Schizophrenia as a Disorder of Disconnectivity." *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 261 Suppl 2 (November): S150–54.
- Schneider, Jürgen E., Paul J. Cassidy, Craig Lygate, Damian J. Tyler, Frank Wiesmann, Stuart M. Grieve, Karen Hulbert, Kieran Clarke, and Stefan Neubauer. 2003. "Fast, High-Resolution in Vivo Cine Magnetic Resonance Imaging in Normal and Failing Mouse Hearts on a Vertical 11.7 T System." *Journal of Magnetic Resonance Imaging: JMRI* 18 (6): 691–701. doi:10.1002/jmri.10411.
- Schulman, S. P., E. G. Lakatta, J. L. Fleg, L. Lakatta, L. C. Becker, and G. Gerstenblith. 1992. "Age-Related Decline in Left Ventricular Filling at Rest and Exercise." *The American Journal of Physiology* 263 (6 Pt 2): H1932-1938.
- Schwarz, Martin K., Annemarie Scherbarth, Rolf Sprengel, Johann Engelhardt, Patrick Theer, and Guenter Giese. 2015. "Fluorescent-Protein Stabilization and High-Resolution Imaging of Cleared, Intact Mouse Brains." Edited by William H. Merigan. *PLOS ONE* 10 (5): e0124650. doi:10.1371/journal.pone.0124650.
- Scollan, D. F., A. Holmes, R. Winslow, and J. Forder. 1998. "Histological Validation of Myocardial Microstructure Obtained from Diffusion Tensor Magnetic Resonance Imaging." *The American Journal of Physiology* 275 (6 Pt 2): H2308-2318.
- Smith, Andrew M., Michael C. Mancini, and Shuming Nie. 2009. "Bioimaging: Second Window for in Vivo Imaging." *Nature Nanotechnology* 4 (11): 710–11. doi:10.1038/nnano.2009.326.
- Sosnovik, David E., Choukri Mekkaoui, Shuning Huang, Howard H. Chen, Guangping Dai, Christian T. Stoeck, Soeun Ngoy, et al. 2014. "Microstructural Impact of Ischemia and Bone Marrow-Derived Cell Therapy Revealed with Diffusion Tensor Magnetic Resonance Imaging Tractography of the Heart in Vivo." *Circulation* 129 (17): 1731–41. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.005841.

- Sosnovik, David E, Ruopeng Wang, Guangping Dai, Timothy G Reese, and Van J Wedeen. 2009. "Diffusion MR Tractography of the Heart." *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance* 11 (1): 47. doi:10.1186/1532-429X-11-47.
- Streeter, D. D., and W. T. Hanna. 1973. "Engineering Mechanics for Successive States in Canine Left Ventricular Myocardium. II. Fiber Angle and Sarcomere Length." *Circulation Research* 33 (6): 656–64.
- Streeter, D. D., H. M. Spotnitz, D. P. Patel, J. Ross, and E. H. Sonnenblick. 1969. "Fiber Orientation in the Canine Left Ventricle during Diastole and Systole." *Circulation Research* 24 (3): 339–47. doi:10.1161/01.RES.24.3.339.
- Streeter, Daniel D., and David L. Bassett. 1966. "An Engineering Analysis of Myocardial Fiber Orientation in Pig's Left Ventricle in Systole." *The Anatomical Record* 155 (4): 503–11. doi:10.1002/ar.1091550403.
- Strijkers, Gustav J., Annemiek Bouts, W. Matthijs Blankesteyn, Tim H. J. M. Peeters, Anna Vilanova, Mischa C. van Prooijen, Honorius M. H. F. Sanders, Edwin Heijman, and Klaas Nicolay. 2009. "Diffusion Tensor Imaging of Left Ventricular Remodeling in Response to Myocardial Infarction in the Mouse." *NMR in Biomedicine* 22 (2): 182–90. doi:10.1002/nbm.1299.
- Sun, Jingjing, Sung Jin Lee, Lei Wu, Malisa Sarntinoranont, and Huikai Xie. 2012. "Refractive Index Measurement of Acute Rat Brain Tissue Slices Using Optical Coherence Tomography." *Optics Express* 20 (2): 1084. doi:10.1364/OE.20.001084.
- Sundgren, P. C., Q. Dong, D. Gomez-Hassan, S. K. Mukherji, P. Maly, and R. Welsh. 2004. "Diffusion Tensor Imaging of the Brain: Review of Clinical Applications." *Neuroradiology* 46 (5): 339–50. doi:10.1007/s00234-003-1114-x.
- Sunkin, S. M., L. Ng, C. Lau, T. Dolbeare, T. L. Gilbert, C. L. Thompson, M. Hawrylycz, and C. Dang. 2013. "Allen Brain Atlas: An Integrated Spatio-Temporal Portal for Exploring the Central Nervous System." *Nucleic Acids Research* 41 (D1): D996–1008. doi:10.1093/nar/gks1042.



- Swinne, C. J., E. P. Shapiro, S. D. Lima, and J. L. Fleg. 1992. "Age-Associated Changes in Left Ventricular Diastolic Performance during Isometric Exercise in Normal Subjects." *The American Journal of Cardiology* 69 (8): 823–26.
- Taccardi, B., E. Macchi, R. L. Lux, P. R. Ershler, S. Spaggiari, S. Baruffi, and Y. Vyhmeister. 1994. "Effect of Myocardial Fiber Direction on Epicardial Potentials." *Circulation* 90 (6): 3076–90. doi:10.1161/01.CIR.90.6.3076.
- Tardif, Pier-Luc, Marie-Jeanne Bertrand, Maxime Abran, Alexandre Castonguay, Joël Lefebvre, Barbara Stähli, Nolwenn Merlet, et al. 2016. "Validating Intravascular Imaging with Serial Optical Coherence Tomography and Confocal Fluorescence Microscopy." *International Journal of Molecular Sciences* 17 (12): 2110. doi:10.3390/ijms17122110.
- Tearney, G. J., B. E. Bouma, and J. G. Fujimoto. 1997. "High-Speed Phase- and Group-Delay Scanning with a Grating-Based Phase Control Delay Line." *Optics Letters* 22 (23): 1811–13.
- Tomer, Raju, Li Ye, Brian Hsueh, and Karl Deisseroth. 2014. "Advanced CLARITY for Rapid and High-Resolution Imaging of Intact Tissues." *Nature Protocols* 9 (7): 1682–97. doi:10.1038/nprot.2014.123.
- Tsai, P. S., J. P. Kaufhold, P. Blinder, B. Friedman, P. J. Drew, H. J. Karten, P. D. Lyden, and D. Kleinfeld. 2009. "Correlations of Neuronal and Microvascular Densities in Murine Cortex Revealed by Direct Counting and Colocalization of Nuclei and Vessels." *Journal of Neuroscience* 29 (46): 14553–70. doi:10.1523/JNEUROSCI.3287-09.2009.
- Tsai, Philbert S., Beth Friedman, Agustin I. Ifarraguerri, Beverly D. Thompson, Varda Lev-Ram, Chris B. Schaffer, Qing Xiong, Roger Y. Tsien, Jeffrey A. Squier, and David Kleinfeld. 2003. "All-Optical Histology Using Ultrashort Laser Pulses." *Neuron* 39 (1): 27–41. doi:10.1016/S0896-6273(03)00370-2.
- Tustison, Nicholas J., Brian B. Avants, Philip A. Cook, Yuanjie Zheng, Alexander Egan, Paul A. Yushkevich, and James C. Gee. 2010. "N4ITK: Improved N3 Bias Correction." *IEEE Transactions on Medical Imaging* 29 (6): 1310–20. doi:10.1109/TMI.2010.2046908.

- Vermeer, K. A., J. Mo, J. J. A. Weda, H. G. Lemij, and J. F. de Boer. 2014. "Depth-Resolved Model-Based Reconstruction of Attenuation Coefficients in Optical Coherence Tomography." *Biomedical Optics Express* 5 (1): 322. doi:10.1364/BOE.5.000322.
- Vousden, Dulcie A., Jonathan Epp, Hiroyuki Okuno, Brian J. Nieman, Matthijs van Eede, Jun Dazai, Timothy Ragan, et al. 2015. "Whole-Brain Mapping of Behaviourally Induced Neural Activation in Mice." *Brain Structure and Function* 220 (4): 2043–57. doi:10.1007/s00429-014-0774-0.
- Walt, Stéfan van der, Johannes L. Schönberger, Juan Nunez-Iglesias, François Boulogne, Joshua D. Warner, Neil Yager, Emmanuelle Gouillart, Tony Yu, and scikit-image contributors. 2014. "Scikit-Image: Image Processing in Python." *PeerJ* 2: e453. doi:10.7717/peerj.453.
- Wang, Hui, Muhammad K. Al-Qaisi, and Taner Akkin. 2010. "Polarization-Maintaining Fiber Based Polarization-Sensitive Optical Coherence Tomography in Spectral Domain." *Optics Letters* 35 (2): 154. doi:10.1364/OL.35.000154.
- Wang, Hui, Adam J. Black, Junfeng Zhu, Tyler W. Stigen, Muhammad K. Al-Qaisi, Theoden I. Netoff, Aviva Abosch, and Taner Akkin. 2011. "Reconstructing Micrometer-Scale Fiber Pathways in the Brain: Multi-Contrast Optical Coherence Tomography Based Tractography." *NeuroImage* 58 (4): 984–92. doi:10.1016/j.neuroimage.2011.07.005.
- Wang, Hui, Christophe Lenglet, and Taner Akkin. 2015. "Structure Tensor Analysis of Serial Optical Coherence Scanner Images for Mapping Fiber Orientations and Tractography in the Brain." *Journal of Biomedical Optics* 20 (3): 36003. doi:10.1117/1.JBO.20.3.036003.
- Wang, Hui, Junfeng Zhu, and Taner Akkin. 2014. "Serial Optical Coherence Scanner for Large-Scale Brain Imaging at Microscopic Resolution." *NeuroImage* 84 (January): 1007–17. doi:10.1016/j.neuroimage.2013.09.063.
- Wang, Hui, Junfeng Zhu, Martin Reuter, Louis N. Vinke, Anastasia Yendiki, David A. Boas, Bruce Fischl, and Taner Akkin. 2014. "Cross-Validation of Serial Optical Coherence Scanning and Diffusion Tensor Imaging: A Study on Neural Fiber Maps in Human Medulla Oblongata." *NeuroImage* 100 (October): 395–404. doi:10.1016/j.neuroimage.2014.06.032.

- Wang, Kun, Meng Liang, Liang Wang, Lixia Tian, Xinqing Zhang, Kuncheng Li, and Tianzi Jiang. 2007. "Altered Functional Connectivity in Early Alzheimer's Disease: A Resting-State fMRI Study." *Human Brain Mapping* 28 (10): 967–78.
- Wang, Y., K. Zhang, N. B. Wasala, X. Yao, D. Duan, and G. Yao. 2014. "Histology Validation of Mapping Depth-Resolved Cardiac Fiber Orientation in Fresh Mouse Heart Using Optical Polarization Tractography." *Biomedical Optics Express* 5 (8): 2843. doi:10.1364/BOE.5.002843.
- Wang, Yuanbo, and Gang Yao. 2013. "Optical Tractography of the Mouse Heart Using Polarization-Sensitive Optical Coherence Tomography." *Biomedical Optics Express* 4 (11): 2540. doi:10.1364/BOE.4.002540.
- Wehrl, Hans F., Ilja Bezrukov, Stefan Wiehr, Mareike Lehnhoff, Kerstin Fuchs, Julia G. Mannheim, Leticia Quintanilla-Martinez, et al. 2015. "Assessment of Murine Brain Tissue Shrinkage Caused by Different Histological Fixatives Using Magnetic Resonance and Computed Tomography Imaging." *Histology and Histopathology* 30 (5): 601–13.
- Weisbecker, Vera. 2012. "Distortion in Formalin-Fixed Brains: Using Geometric Morphometrics to Quantify the Worst-Case Scenario in Mice." *Brain Structure and Function* 217 (2): 677–85. doi:10.1007/s00429-011-0366-1.
- Wojtkowski, Maciej, Rainer Leitgeb, Andrzej Kowalczyk, Tomasz Bajraszewski, and Adolf F. Fercher. 2002. "In Vivo Human Retinal Imaging by Fourier Domain Optical Coherence Tomography." *Journal of Biomedical Optics* 7 (3): 457. doi:10.1117/1.1482379.
- Wojtkowski, Maciej, Vivek Srinivasan, Tony Ko, James Fujimoto, Andrzej Kowalczyk, and Jay Duker. 2004. "Ultrahigh-Resolution, High-Speed, Fourier Domain Optical Coherence Tomography and Methods for Dispersion Compensation." *Optics Express* 12 (11): 2404–22.
- Wu, Dan, Jiadi Xu, Michael T. McMahon, Peter C.M. van Zijl, Susumu Mori, Frances J. Northington, and Jiangyang Zhang. 2013. "In Vivo High-Resolution Diffusion Tensor Imaging of the Mouse Brain." *NeuroImage* 83 (December): 18–26. doi:10.1016/j.neuroimage.2013.06.012.

- Xu, Chris, and Watt W. Webb. 1996. "Measurement of Two-Photon Excitation Cross Sections of Molecular Fluorophores with Data from 690 to 1050 Nm." *Journal of the Optical Society of America B* 13 (3): 481. doi:10.1364/JOSAB.13.000481.
- Yun, S., G. Tearney, Johannes de Boer, N. Iftimia, and B. Bouma. 2003. "High-Speed Optical Frequency-Domain Imaging." *Optics Express* 11 (22): 2953. doi:10.1364/OE.11.002953.
- Yushkevich, Paul A., Brian B. Avants, Lydia Ng, Michael Hawrylycz, Pablo D. Burstein, Hui Zhang, and James C. Gee. 2006. "3D Mouse Brain Reconstruction from Histology Using a Coarse-to-Fine Approach." In *Biomedical Image Registration*, edited by Josien P. W. Pluim, Boštjan Likar, and Frans A. Gerritsen, 4057:230–37. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. doi:10.1007/11784012\_28.